

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**



Tesis Doctoral

**Adaptación de *Azoarcus* sp. CIB
a diferentes condiciones
ambientales**

Helga Fernández Llamosas

Madrid, 2018

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**



Tesis Doctoral

**Adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a
diferentes condiciones ambientales**

Helga Fernández Llamosas

Directores:

Dr. Manuel Carmona Pérez

Dr. Eduardo Díaz Fernández



**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Centro de Investigaciones Biológicas**

Tutora:

Dra. Marta Martín Basanta

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias**

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Biología Medioambiental, del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) de Madrid.

La investigación ha sido financiada mediante un Contrato para la Formación de Doctores (BES-2013-063052) del Ministerio de Economía, Industria y competitividad y los proyectos BIO2012-39501 y BIO2016-79736.

*Cuando a medianoche se escuche
pasar una invisible comparsa
con música maravillosa y grandes voces,
tu suerte que declina, tus obras fracasadas
los planes de tu vida que resultaron errados
no llores vanamente.
Como hombre preparado desde tiempo atrás,
como un valiente,
di tu adiós a Alejandria, que se aleja.
No te engañes, NO DIGAS QUE FUE UN SUEÑO.
No aceptes tan vanas esperanzas.
Como hombre preparado desde tiempo atrás,
como un valiente,
como corresponde a quien de tal ciudad fue digno
acércate con paso firme a la ventana,
y escucha con emoción -no con lamentos
ni ruegos de débiles- como último placer,
los sonos, los maravillosos instrumentos de la
comparsa misteriosa
y di tu adiós a esa Alejandria
que pierdes para siempre.*

CAVAFIS, El dios abandona a Antonio

*A QUIENES
SIEMPRE
CONFIARON EN MÍ*

Agradecimientos

Han pasado más de cinco largos años desde la primera vez que atravesé la puerta del CIB persiguiendo un sueño que ahora se materializa. Resultan inimaginables e indescriptibles la cantidad de sensaciones y personas que han pasado por mi vida en este espacio de tiempo en el que tantos sentimientos se han condensado y magnificado y que, en su conjunto, me han permitido llegar por fin hasta aquí.

En primer lugar, no puedo dejar de agradecer a mis dos directores de tesis, Manuel Carmona y Eduardo Díaz, el haber confiado en mí primero como alumna de máster y, más tarde, por haberme dado la oportunidad de continuar mi formación con la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias por haberme ensañado lo que es la Ciencia, por todas las conversaciones mantenidas que derivaban en nuevos retos y experimentos y por haber sido dos grandes guías a lo largo de este camino.

Agradezco también toda la ayuda e ideas aportadas en los seminarios científicos por los demás jefes “rubenes”: José Luis, Auxí, Pedro y Ernesto (gracias por aconsejarme y alegrarme tantos días grises). Así como a los servicios científicos del CIB, especialmente los servicios de microscopía (confocal y electrónica), por su gran ayuda y aportación técnica.

También quisiera agradecer de forma muy especial a todos aquellos que me han acogido en diferentes etapas de la Tesis, ayudándome a comprender nuevas técnicas. A Rafael Riviña y Marta Martín de la UAM, a Mercedes Fernández-Pascual del ICA-CSIC, a Jaco Vangronsveld y Sofie Thijs de la Universidad de Hasselt y a Laura Castro de la UCM.

*Por supuesto, y espero no olvidarme de nadie, esta Tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y el compañerismo de todos los “Rubenes”, por haber sido mi segunda familia (y a la que he visto en estos años más que a la propia). ¡Da vértigo pensar la cantidad de gente que ha pasado por el laboratorio en estos cinco años! Ana, porque sin ti el laboratorio no podría funcionar cada día, gracias por todo el apoyo y el cariño (sin abrazos) aportado durante todos estos años. Bea, ¡qué sería de nosotros, y del grupo de Whatsapp, sin ti! Gracias por tu apoyo personal, y laboral, y gracias por sacar siempre tiempo de donde no lo hay para ofrecer tu ayuda y tus conocimientos. A Tere y Zaira, por haber sido mis grandes maestras en la “domesticación” de *Azoarcus*, gracias por ser un ejemplo a seguir en lo personal y en lo laboral, os echo de menos... A Loreine, por haberme demostrado que la distancia no es impedimento para conservar una verdadera amistad, por haberme ayudado en los momentos más difíciles y por haber disfrutado en cada buena ocasión que se ha presentado, ¡en nada estás de vuelta! A Julia, por tantos años de amistad que espero continúen, por ser un alma cazurra en Madrid con la que poder recordar viejas anécdotas*

y ayudarme a poner los pies en tierra. A Carmen, porque tus teorías filosóficas nos ayudan a ver la vida de una manera más divertida. Gracias por todo vuestro apoyo.

Por supuesto un agradecimiento especial a los postdocs del grupo, Helena y Gonzalo, por toda la ayuda, protocolos y conocimientos compartidos, por no perder nunca la sonrisa y por todos los grandes momentos de risas y “pavo” que me habéis dado; a Igor, por recordarnos cada viernes que el fin de semana estaba a la vuelta de la esquina. Al equipo cafetero, por hacer más llevadero el día a día y por haber sido un gran gabinete de (anti)crisis: Juan, gracias por todo el apoyo dado durante estos años, por haber sido un gran “donpato” y por ser un gran científico y mejor persona, ¡mucho ánimo en la recta final!; David por ser mi compañero de penas “azoarqueras” en esta última etapa; Lucía, por tu sinceridad y disposición, desde luego que el CIB no fue lo mismo desde tu marcha al CNB; Gerardo; Sonia; Dina... ¡se os echaba de menos! A Miriam, Susana y Roberto, la resistencia “pneumo”, gracias por vuestro cariño y por todo la ayuda que siempre he recibido en las visitas al 340-341. A estas alturas es imposible no guardar un gran recuerdo de todos los que estaban cuando llegué y se fueron yendo: Iria, Esther (aunque nunca se haya ido del todo), Andrés (y sus novatadas), Nina, Carlos, Rober, Héctor, Fernando, Pilar, Virginia... a los que fueron llegando y marcharon antes que yo: Dani (gracias por toda tu ayuda y consejos en las primeras etapas), Lorena, Olga, Laura, Nano... y por supuesto a todos los que continuáis en los Rubenes: Elena, Pablo, Alberto, Manuel, Ana María, Irene, Érika, Fran, María, Arantxa, Cris, Natalia T., Natalia H., Virginia, Sergio, Ryan... ¡gracias a todos!

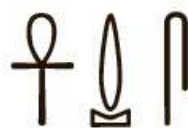
Y porque si los Rubenes han sido una segunda familia...no puedo olvidar a la otra gran familia del CIB. Sois tantos los que habéis compartido algún momento de estos años y a los que tengo tanto que agradecer... A Adrián, por las cañas, futbolines, billares que nunca tuvieron lugar... A Lucía por Villafeliz de la Sobarriba que fue nuestro hogar durante un intenso año, ¡gracias por todo! Quiero agradecer especialmente a toda mi gente “de la primera” (y asociados). Gracias a Nohemí, por ser tan única y genial y llenar de buen ambiente cada oportunidad que se presta; Mónica, Noemí, Alejandra, Elvira (queremos más conciertos de Srta. Trixie), Estefi, Sheila, por todos aquellos días locos de manualidades y manifestaciones, y Emi, por tu sonrisa, optimismo y por cada consejo dado. A Marta, Lucía y Silvia, me es imposible no incluíros en un “triunvirato”, gracias por cada momento compartido, que seguro serán muchos más, por cada plan que ha ido surgiendo, cada viaje, cada risa y cada paraguayo. Gracias a Carol y Bea, por vuestro positivismo y vuestro cariño. Y por supuesto, no me olvido de vosotros: Miguel, por ser mi gran apoyo, por haberme aguantado cuando no lo hacía ni yo, por no fallar nunca y por ser la chispa de la vida; e Irene, qué decirte que no te haya dicho ya, gracias por toda la ayuda ofrecida, por toda la confianza que me has dado y sobre todo gracias por cada segundo vivido; sólo por

haberlos conocido, este viaje ha merecido la pena. Siempre os llevaré conmigo allá a donde vaya, ¡os quiero!

Gracias también a mi gente, la que me acompaña desde que este camino realmente comenzó, allá por el 2006, en el Campus de Vegazana: Sara, Silvia y Ángela y a quienes se han ido “asociando”: Noa, África, Santos, Sara, Carmen y Mertxe. Gracias por haber seguido siempre ahí, por todo vuestro apoyo, vuestro cariño, por Florencia, Toriellu, León, Jerez, Ponferrada y Pepino, y por todos los proyectos y momentos que nos quedan por vivir. También a quienes han llegado hace poco pero que sé que se quedarán por mucho tiempo, mi equipo internacional: Valeria, Iva, Sofie, Jordan, Lukasz, Giselle, Giulia, Francisco, Wouter... Dank je wel! Lo que Bélgica unió que no lo separe el mundo.

Y ahora sí, aunque las palabras se quedan cortas para expresar y recoger todo el agradecimiento y admiración que siento hacia mi familia, la que siempre ha estado y estará, la que siempre ha confiado en mí y ha hecho todo lo posible, y más, para poder ofrecermé un futuro y la posibilidad de haber ido forjando el camino hacia aquí. Gracias a mis padres, por ser mi punto de apoyo, los que nunca han dejado que me rinda y quienes me han enseñado a levantarme una y otra vez. Gracias Nieves, por aguantarme cada segundo, a mí y a mis frikadas, por soportar que llegara a casa y hablara “raro” de cosas científicas que ni te van ni te vienen, gracias por apoyarme, por hacerme disfrutar la vida y por sacarme siempre una sonrisa, incluso en los peores momentos, porque como dijo aquel sabio vietnamita: “podrás perder mil batallas, pero solamente al perder la sonrisa habrás conocido la auténtica derrota”.

Gracias, gracias de verdad a todos y cada uno de vosotros.



ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. CLAVE DE ABREVIATURAS	5
III. INTRODUCCIÓN	9
1. El género <i>Azoarcus</i> y la cepa <i>Azoarcus</i> sp. CIB	11
2. Interacciones planta-bacteria	13
2.1. La rizosfera	14
2.2. Bacterias endófitas	18
2.2.1. Factores implicados en la colonización de la endorrizosfera por bacterias endófitas	21
2.3. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs)	24
2.3.1. Mecanismos de fitoestimulación	26
2.3.2. Mecanismos de biofertilización	29
2.3.3. Mecanismos de biocontrol	32
3. Papel del di-GMPc durante la interacción planta-bacteria	33
4. Descripción de cepas endófitas en el género <i>Azoarcus</i>	36
4.1. Identificación de genes relacionados con un estilo de vida endófito en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	39
5. Resistencia bacteriana a metales pesados	41
6. Resistencia bacteriana a metaloides: selenio y telurio	45
6.1. Resistencia a selenio	45
6.2. Resistencia a telurio	50
7. Metabolismo bacteriano del arsénico	53
7.1 Detoxificación de arseniato: genes <i>ars</i>	56
7.2. Respiración de arseniato: genes <i>arr</i>	59
7.3. Oxidación aeróbica de arsenito: genes <i>aio</i>	61
7.4. Oxidación anaeróbica de arsenito: genes <i>arx</i>	62
8. Estudios sobre la resistencia metales pesados y metaloides en bacterias del género <i>Azoarcus</i>	64
8.1. Genes relacionados con la resistecia a metales pesados y metaloides en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	64
IV. OBJETIVOS	67

V. MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Cepas bacterianas, plásmidos y semillas	72
2. Medios y condiciones de cultivo	74
2.1. Medios de cultivo utilizados para <i>Azoarcus</i> sp. CIB, <i>A. communis</i> y <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	74
2.2. Medios de cultivo utilizados para <i>E. coli</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>B. phytofirmans</i>	77
2.3. Antibióticos	77
2.4. Obtención de condiciones anaeróbicas	77
2.5. Condiciones de cultivo bacteriano	78
2.6. Conservación de cepas bacterianas	78
3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA	78
3.1. Extracción y purificación de DNA	79
3.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)	79
3.3. Secuenciación automática de DNA	84
3.4. Extracción y purificación de RNA	84
3.5. Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR) y PCR cuantitativa	84
3.6. Electroforesis en geles de agarosa	85
4. Procedimientos de transferencia génica	86
4.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico o electroporación	86
4.2. Transferencia de plásmidos a <i>Azoarcus</i> sp. CIB mediante conjugación biparental	87
5. Construcción de cepas mutantes de inserción en <i>Azoarcus</i> sp. CIB por recombinación homóloga	87
6. Ensayos realizados para el estudio de la interacción <i>Azoarcus</i> sp. CIB-planta	89
6.1. Ensayos de caracterización fenotípica de cepas de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	89

6.1.1. Solubilización de fosfatos	89
6.1.2. Producción de ácido indolacético (IAA)	89
6.1.3. Ensayos de movilidad	90
6.1.4. Morfología de colonia	90
6.2. Ensayos enzimáticos	90
6.2.1. Ensayo de fijación de nitrógeno	90
6.2.2. Ensayo de la actividad ACC desaminasa	91
6.2.3. Ensayo de la actividad superóxido dismutasa en arroz	91
6.3. Ensayos <i>in vivo</i> con arroz	92
6.3.1. Inoculación de plántulas de arroz	92
6.3.2. Recuperación y cuantificación de endófitos	92
6.3.3. Ensayos de crecimiento de arroz inoculado con <i>Azoarcus</i> sp. CIB en cámara de cultivo	93
6.3.4. Ensayos de crecimiento de arroz en invernadero	93
6.4. Análisis transcriptómico de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en presencia de extractos de arroz	94
6.4.1. Obtención de los extractos de raíz de arroz y preparación de las muestras de RNA	94
6.4.2. Construcción de librerías de cDNA, secuenciación y análisis bioinformático	94
7. Ensayos de reducción de selenito/telurito y producción de SeNPs y TeNPs	95
7.1. Monitorización de la producción de SeNPs/TeNPs	95
7.2.2. Purificación de las SeNPs	97
8. Técnicas de microscopía	97
8.1. Microscopía óptica de epifluorescencia y confocal	97
8.2. Microscopía electrónica	98
8.2.1. Microscopía electrónica de transmisión de inclusiones de <i>Azoarcus</i> sp. CIB-raíz de arroz e inmunolocalización de NifH	98

8.2.2. Microscopía electrónica de transmisión y análisis de difracción de rayos X para caracterización de de SeNPs y TeNPs	99
8.3. Microscopía electrónica de barrido	100
9. Recursos informáticos	100
9.1. Análisis bioinformáticos	100
9.2. Análisis estadísticos	101
VI. RESULTADOS	103
1. Estudio de la capacidad de <i>Azoarcus</i> sp. CIB para vivir como endófito	105
1.1. Aislamiento de <i>Azoarcus</i> sp. CIB del interior de raíces de arroz	105
1.2. Visualización <i>in planta</i> de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	106
2. Caracterización de las propiedades PGP de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	111
2.1. Fijación de nitrógeno	111
2.2. Solubilización de fosfato inorgánico	112
2.3. Producción de ácido indolacético (IAA)	113
2.4. <i>Azoarcus</i> sp. CIB no es patógeno de plantas	114
2.5. Efecto de la inoculación de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en plantas de arroz	115
3. Implementación de una nueva propiedad PGP en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	116
3.1. Clonación y expresión del gen <i>acdS</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	117
3.2. Efecto de la inoculación de la cepa recombinante <i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237 <i>acdS</i>) en plantas de arroz	118
4. Implicación de la movilidad en el establecimiento del estilo de vida endófito en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	121
4.1. Implicación de los <i>pili</i> tipo IV en la interacción entre <i>Azoarcus</i> sp. CIB y el arroz	122
4.2. El flagelo de <i>Azoarcus</i> sp. CIB es necesario para la colonización	124
5. Estudio de expresión génica global de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en presencia de extractos de raíz de arroz	126

5.1. Extracción de RNA y secuenciación de cDNA	127
5.2. Análisis de los genes diferencialmente expresados en presencia de extractos de raíz de arroz	128
6. Papel de un posible <i>cluster</i> de biosíntesis/modificación de exopolisacárido en la interacción entre <i>Azoarcus</i> sp. CIB y el arroz	134
7. Implicación de los niveles de di-GMPc en el establecimiento del estilo de vida endófito en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	137
8. Resistencia de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a metales pesados y metaloides	141
9. Resistencia y formación de nanopartículas de selenio y telurio por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	143
9.1. Resistencia y reducción del selenito por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	143
9.1.1. Producción de SeNPs por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	145
9.1.2. Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a selenito	148
9.1.3. Sistemas alternativos de producción de SeNPs basado en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	150
9.2. Resistencia a telurito y formación de TeNPs por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	153
10. Identificación y estudio de los <i>clusters</i> génicos relacionados con la resistencia a arsénico en <i>Azoarcus</i> sp.	157
10.1. Resistencia a arseniato: genes <i>ars</i>	157
10.2. Resistencia a arsenito: el <i>cluster arx</i>	162
VII. ANEXO I	167
VIII. DISCUSIÓN	181
1. <i>Azoarcus</i> sp. CIB es capaz de desarrollar un estilo de vida endófito y posee características de PGPB	183
2. <i>Azoarcus</i> sp. CIB es capaz de promover el crecimiento del arroz	189
3. Identificación de genes de <i>Azoarcus</i> sp. CIB implicados en la adaptación a un estilo de vida endófito	192

3.1. Estudio de los genes del flagelo y de los <i>pili</i> tipo IV en la interacción <i>Azoarcus</i> sp. CIB-planta	193
3.2. Análisis transcriptómico global en respuesta a extractos de raíz de arroz	198
4. Efecto de la modificación de los niveles de di-GMPc sobre la capacidad colonizadora de arroz de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	204
5. Capacidad de resistencia a metales pesados y metaloides por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	208
6. Estudio de la capacidad de resistencia a selenio y telurio por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	211
6.1. Mecanismos moleculares de resistencia a selenio y telurio en <i>azoarcus</i> sp. CIB	211
6.2. Análisis de la producción de SeNPs y TeNPs por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	218
7. Resistencia a arseniato y arsenito por <i>Azoarcus</i> sp. CIB	223
7.1. El <i>cluster ars</i> está implicado en la resistencia de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a arseniato	224
7.2. Implicación del <i>cluster arx</i> en la utilización de arseniato como fuente de energía en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	228
IX. CONCLUSIONES	235
X. BIBLIOGRAFÍA	241

I. RESUMEN

Las bacterias del género *Azoarcus* descritas hasta la fecha pueden clasificarse en dos grupos ecofisiológicos bien diferenciados, por un lado, bacterias con capacidad para establecerse como endófitos de plantas y, por otro lado, bacterias capaces de degradar anaeróbicamente una gran variedad de compuestos aromáticos. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado como modelo de estudio la bacteria *Azoarcus* sp. CIB, una cepa anaeróbica facultativa que ha sido ampliamente utilizada para el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. Se ha demostrado por primera vez la capacidad de una bacteria del género *Azoarcus* perteneciente al subgrupo de degradadores anaeróbicos de compuestos aromáticos para establecerse como endófito de arroz y se han estudiado las propiedades que posee *Azoarcus* sp. CIB para promover el crecimiento de la planta. Además, se ha demostrado el papel de los *pili* tipo IV, el flagelo y el exopolisacárido en la colonización del arroz, y se han implementado las propiedades beneficiosas de la cepa CIB mediante la construcción de una cepa recombinante con actividad ACC desaminasa. Con el fin de entender los mecanismos moleculares implicados en el estilo de vida endofítico, se ha realizado un análisis transcriptómico global frente a extractos de raíz de arroz y se ha abordado el papel regulador que puede tener el di-GMPc en la interacción planta-endófito.

Por otro lado, en esta Tesis también se ha investigado la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a otras condiciones ambientales que no habían sido estudiadas anteriormente y que revelan la gran versatilidad metabólica de esta bacteria. Así, se han abordado algunos de los mecanismos de resistencia a metales pesados (cadmio, níquel, zinc) y metaloides (selenito, telurito, arseniato y arsenito), que no habían sido previamente caracterizados en ninguna cepa del género *Azoarcus*. Un aspecto de gran relevancia biotecnológica ha sido el estudio de la capacidad de acoplar la resistencia a selenito y telurito a la formación de nanopartículas. Finalmente, se ha confirmado que la cepa CIB es capaz de resistir arseniato (genes *ars*) y de utilizar arsenito como fuente adicional de energía en condiciones anaeróbicas, caracterizándose el primer *cluster arx*, que codifica una arsenito oxidasa anaeróbica, en un organismo heterótrofo y que también está implicada en la resistencia al arsenito.

The genus *Azoarcus* harbors a high diversity of bacteria that have been classified in two different ecophysiological groups: on one hand, a group of bacteria that can live as plant endophytes and, on the other hand, a group of bacteria specialized in the anaerobic degradation of a wide range of aromatic compounds. In this thesis, we have used *Azoarcus* sp. CIB, a facultative anaerobe studied by its ability to degrade aromatic compounds anaerobically, as a model. For the first time, this work proves the ability to develop an endophytic lifestyle of an *Azoarcus* strain belonging to the specialized group of aromatic compounds degraders in anoxic conditions and its plant growth promotion properties has been characterized. Furthermore, the role of type IV *pili*, flagella and exopolysaccharide during plant colonization has been elucidated and its plant beneficial properties has been improved by the construction of a recombinant strain with ACC deaminase activity. A global transcriptomic approach in response to rice root extracts has been also carried out in order to understand the molecular mechanisms involved in the endophytic lifestyle and the role of the global regulator c-di-GMP during plant-endophyte interaction has been addressed.

On the other hand, in this thesis has also been investigated the adaptation of *Azoarcus* sp. CIB to environmental conditions that have never been studied before and that confirms the high metabolic versatility of this strain. Thus, the resistance to some heavy metals (cadmium, nickel, zinc) and metalloids (selenite, tellurite, arsenate and arsenite) has been determined representing the first report about heavy metal and metalloid resistance in a strain of the genus *Azoarcus*. In this sense, the fact that selenite and tellurite resistance is couple to nanoparticles formation have also a great biotechnological interest. Finally, it has been demonstrated that *Azoarcus* sp. CIB is able to resist arsenate (*ars* genes) and to use arsenite as supplementary energy source, under anaerobic conditions, and the putative *arx* cluster, coding the anaerobic arsenite oxidase, has been characterized for the first time in a heterotrophic strain, being related with the use of arsenite as energy source and in arsenite resistance.

II. CLAVE DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
A	Adenina
A ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm
aa	Aminoácidos
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
BNF	Fijación biológica del nitrógeno (<i>biological nitrogen fixation</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Citosina
cDNA	DNA complementario
CIB	<i>Azoarcus</i> sp. CIB
CoA	Coenzima A
COG	Cluster de grupos de ortólogos (<i>cluster of orthologous groups</i>)
DEGs	Genes diferencialmente expresados (<i>differentially expressed genes</i>)
DGC	Diguanilato ciclasa
di-GMPc	Ácido di-(3' 5') guanosín-monofosfato cíclico
DMDSe	Dimetildiseleniuro
DMSe	Dimetilseleniuro
DMTe	Dimetiltelururo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	2,4-dinitrofenol
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EDX	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (<i>energy dispersive x-ray</i>)
F	Faradio
FDR	Tasa de descubrimientos falsos (<i>false discovery rate</i>)
Fig.	Figura
g	Aceleración gravitacional
G	Guanina
GOR	Glutación reductasa
GST	Glutación-S-transferasa
IAA	Ácido indolacético (<i>indol acetic acid</i>)
ICP-OES	Plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrometría de emisión óptica (<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ISR	Resistencia sistémica inducida (<i>induce systemic resistance</i>)
Kb	Kilobase(s)
kV	Kilovoltio(s)
LB	Medio <i>Lysogeny Broth</i>
M	Molar
MIC	Concentración mínima inhibitoria (<i>minimum inhibitory concentration</i>)
mRNA	RNA mensajero
m/v	Masa/volumen
nm	Nanometros
Nº	Número
pb	Pares de bases

Clave de abreviaturas

PCR	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
PDE	Fosfodiesterasa
PGP	Promoción del crecimiento de plantas (<i>plan growth promotion</i>)
PGPB(s)	Bacteria(s) promotora del crecimiento de plantas (<i>plant growth promoting bacteria</i>)
ppm	Partes por millón
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RPKM	Unidad de normalización de lecturas por gen en RNA-seq (<i>reads per kilobase of transcript per million mapped reads</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
SAED	Difracción de electrones en área seleccionada
SAR	Resistencia sistémica adquirida (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electronic microscopy</i>)
SeNPs	Nanopartículas de selenio
SOD	Enzima superóxido dismutasa
T	Timina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>transmission electron microscopy</i>)
TeNPs	Nanopartículas de telurio
U	Unidad de actividad enzimática
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
Ω	Ohmio

III. INTRODUCCIÓN

1.- El género *Azoarcus* y la cepa *Azoarcus* sp. CIB

La microbiología ambiental puede definirse como el estudio de los microorganismos, de su interacción con otros organismos y de su impacto sobre el medio ambiente (Pillai *et al.*, 2015). Se trata, por tanto, de un amplio campo de estudio en el que, debido a la gran diversidad y plasticidad metabólica de los microorganismos, en particular de las bacterias, se han explorado un amplio abanico de sistemas y modelos. Así, cabe destacar el amplio conocimiento existente sobre el impacto de estos microorganismos en los ciclos biogeoquímicos (Falkowski *et al.*, 2008), en la agricultura (Gopal y Gupta, 2016), en la biodegradación de contaminantes recalcitrantes como los hidrocarburos aromáticos (Carmona *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2013) o los pesticidas (Parte *et al.*, 2017), o en inmovilización de metales/metaloideos (Gadd, 2010).

Entre la gran diversidad de géneros de bacterias de interés medioambiental, esta Tesis Doctoral se va a centrar en el género *Azoarcus* y, específicamente, en la cepa *Azoarcus* sp. CIB. El género *Azoarcus* se engloba dentro de las β -Proteobacterias, concretamente en el orden de los *Rhodocyclales* (Martín-Moldes *et al.*, 2015), tratándose de un grupo de bacterias muy diversas y versátiles que frecuentemente han sido aisladas de suelos, fangos, aguas residuales y rizosfera de las plantas (Rabus *et al.*, 2014). La primera descripción de bacterias pertenecientes a este género se debió al aislamiento de microorganismos endófitos, no pertenecientes a ningún género bacteriano descrito anteriormente, de la gramínea *Leptochloa fusca* L. en Pakistán (Reinhold *et al.*, 1986). Desde entonces, se han descrito al menos diez especies dentro de este género: *Azoarcus indigens* (especie tipo), *Azoarcus communis*, *Azoarcus tolulyticus*, *Azoarcus toluvorans*, *Azoarcus toluclasticus*, *Azoarcus evansii*, *Azoarcus anaerobius*, *Azoarcus buckelii*, *Azoarcus olearius* y *Azoarcus taiwanensis*, además de varias cepas que aún no han sido asignadas a ninguna especie (Martín-Moldes *et al.*, 2015; Faoro *et al.*, 2017), y de la cepa EbN1, identificada inicialmente como miembro del género *Azoarcus* pero clasificada actualmente (aunque todavía no está taxonómicamente aceptado) como "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1 (Rabus *et al.*, 2005).

Sin embargo, todas las cepas descritas hasta el momento parecen clasificarse, de acuerdo a la secuencia del rRNA 16S, en dos clados principales (Fig. 1) que se diferencian tanto a nivel filogenético como ecológico (Hurek y Reinhold-Hurek, 1995; Song *et al.*, 1999; Rabus *et al.*, 2005; Krause *et al.*, 2006; Martín-Moldes *et al.*, 2015). Así, por un lado, se ha identificado un grupo de bacterias especializadas en su establecimiento como endófitos de gramíneas (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2013; Faoro *et al.*, 2017) y, por otro lado, un grupo que incluye a bacterias de vida libre que, principalmente, han sido aisladas de ambientes contaminados, participan en los ciclos biogeoquímicos de un gran abanico de compuestos orgánicos e inorgánicos y han sido ampliamente estudiadas por su gran capacidad para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos.

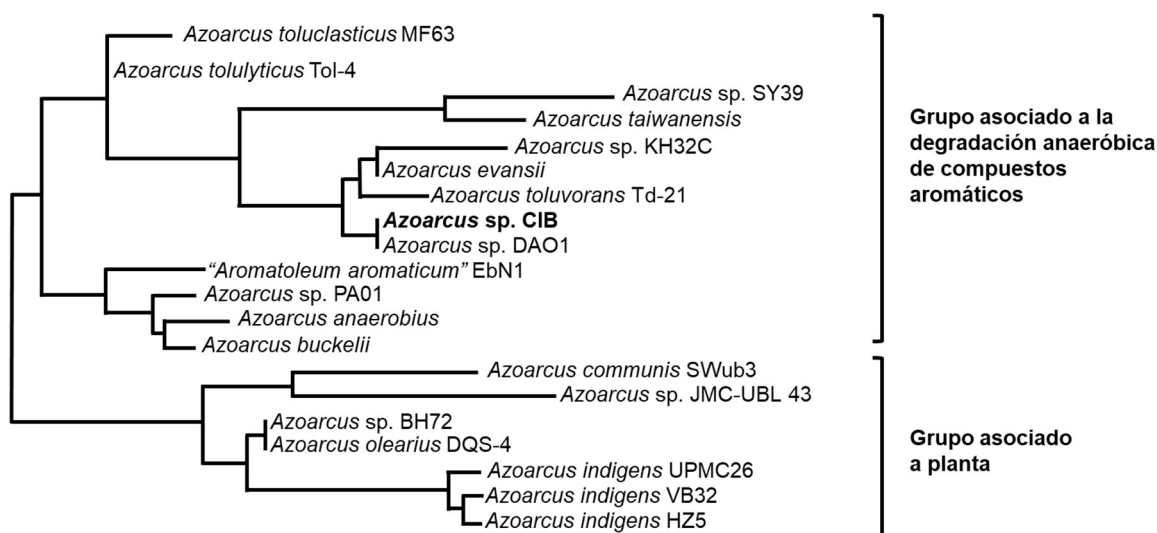


Figura 1. Árbol filogenético del género *Azoarcus*. Se muestra la disposición de cepas representativas del género *Azoarcus* de acuerdo a la secuencia del rRNA16S. En negrita se muestra la cepa *Azoarcus* sp. CIB, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. A continuación, se detalla entre paréntesis los números de acceso de las secuencias 16S analizadas: *A. toluclasticus* MF63 (NR_024970.1), *A. tolulyticus* Tol-4 (NR_037058.1), *Azoarcus* sp. SY39 (KY861745.1), *A. taiwanensis* (GQ389714.1), *Azoarcus* sp. KH32C (AP012304.1), *A. evansii* (NR_029266.1), *A. toluvorans* Td-21 (NR_025915.1), *Azoarcus* sp. CIB (AF515816.2), *Azoarcus* sp. DAO1, "*A. aromaticum*" EbN1 (X83531.1), *Azoarcus* sp. PA01 (KR025921.1), *A. anaerobius* (NR_026438.1), *A. buckelii* (AJ315676.1), *A. communis* SWub3 (NR_024850.1), *Azoarcus* sp. JMC-UBL 43 (HM451445.1), *Azoarcus* sp. BH72 (L15530.1), *A. olearius* DQS-4 (NR_108183.1), *A. indigens* UPMC26 (KP192883.1), *A. indigens* VB32 (L15531.1), *A. indigens* HZ5 (GU592532.1).

Como se ha indicado anteriormente, en este trabajo se ha utilizado *Azoarcus* sp. CIB, una cepa anaerobia facultativa aislada a partir del cultivo N°

12184 de la DMSZ (ya no disponible) que había sido catalogado como la cepa *Azoarcus* sp. M3 (aislada de un acuífero contaminado con hidrocarburos en Suiza). *Azoarcus* sp. CIB ha sido previamente estudiado por su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos, incluyendo los hidrocarburos tolueno y *m*-xileno, tanto en condiciones aeróbicas como, especialmente, en condiciones anaeróbicas respirando nitrato.

Durante los últimos años en nuestro grupo se han identificado y caracterizado a nivel molecular varias rutas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB así como los circuitos genéticos que controlan su regulación transcripcional (López-Barragán *et al.*, 2004; Blázquez *et al.*, 2008; Valderrama *et al.*, 2012; Durante-Rodríguez *et al.*, 2013; Juárez *et al.*, 2013; Martín-Moldes, 2014). Es por ello que esta bacteria constituye actualmente uno de los microorganismos modelo empleados en los estudios sobre la genética y regulación de las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos. Sin embargo, el análisis del genoma de la cepa CIB reveló un potencial metabólico y de adaptación a diferentes condiciones ambientales muy superior al inicialmente determinado por su capacidad para degradar compuestos aromáticos, abriendo la posibilidad de su aplicación en nuevas líneas de investigación como la interacción con planta y la resistencia a metales pesados y metaloides que han sido objeto de estudio en esta Tesis.

2.- Interacciones planta-bacteria

Las plantas establecen relaciones complejas con todo tipo de organismos de su entorno natural, siendo las bacterias los más numerosos y pudiendo llegar a representar hasta el 95% del total de la microbiota vegetal (Glick, 2012). Cada vez resulta más evidente el papel fundamental que estos microorganismo tienen para la vida de su hospedador, describiéndose la presencia de bacterias en todos los tejidos de la planta, por lo que resulta necesaria la realización de análisis holísticos de la planta y su microbiota asociada (Gopal y Gupta, 2016). No obstante, y debido a la dificultad tecnológica que este tipo de estudios ofrece en la actualidad, los abordajes que se han realizado para estudiar las interacciones

planta-bacteria se han llevado a cabo, mayoritariamente, analizando el efecto que dicha interacción tiene sobre el hospedador y el nicho ecológico en el que ocurren.

De acuerdo al efecto causado sobre la planta, las interacciones de las bacterias con su hospedador se clasifican en beneficiosas, neutras o perjudiciales. Durante años, el estudio de las relaciones planta-bacteria se ha concentrado, mayoritariamente, en dos campos antagónicos con gran impacto en la economía agraria y cuyas rutas de señalización y modo de establecimiento se encuentran bien caracterizadas. Por un lado, se han estudiado ampliamente las interacciones planta-patógeno (Wirthmueller *et al.*, 2013) y, por otro lado, las relaciones simbióticas (Oldroyd *et al.*, 2011). Sin embargo, dentro de las interacciones beneficiosas, las simbióticas son la excepción y se restringen a las interacciones rizobio-leguminosa y a la interacción entre *Frankia* y actinorrizas (Pawlowski y Sirenberg, 2003; Farrar *et al.*, 2014). Muchos otros cultivos de gran importancia agraria como el maíz, el arroz, el trigo, la cebada o la caña de azúcar (gramíneas) no forman estructuras simbióticas específicas sino que establecen relaciones mutualistas con bacterias rizosféricas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005). Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés por dilucidar los mecanismos moleculares que controlan este tipo de interacciones beneficiosas entre plantas no leguminosas y las llamadas PGPBs (*Plant Growth Promoting Bacteria*) que se detallan en el apartado 3.

Dependiendo del nicho ecológico que colonicen las bacterias, se habla de bacterias de la filosfera (hojas y tallos), espermosfera (semillas) y rizosfera (raíces) (Mendes *et al.*, 2013). Sin embargo, y debido entre otras razones a la gran diversidad bacteriana encontrada y al papel primordial de las raíces durante la nutrición vegetal, la rizosfera ha concentrado un gran interés en el estudio de las interacciones beneficiosas planta-bacteria que se desarrollarán en los siguientes apartados.

2.1.- La rizosfera

El término rizosfera fue acuñado por primera vez en 1904 por Lorenz Hiltner que la definió como la tierra en contacto directo con las raíces que presentaba una alta actividad microbiana (Hiltner, 1904). Desde entonces, el término ha incluido

también a otras zonas del entorno radicular, de tal forma que hoy se podría definir la rizosfera como la porción de tierra influenciada por la raíz, incluyendo los tejidos internos y externos de la propia raíz (Lynch, 1990; Pinton *et al.*, 2001). Atendiendo a esta última definición, la rizosfera podría subdividirse a su vez en tres compartimentos bien diferenciados: la ectorrizosfera (zona que comprende el suelo alrededor de las raíces), el rizoplaneo (la superficie radicular) y la endorrizosfera (tejidos internos de la raíz que pueden ser colonizados por bacterias endófitas) (Morgan *et al.*, 2005).

Las raíces pueden llegar a secretar un 30% del carbono fijado por la planta durante la fotosíntesis en forma de exudados, en cuya composición química predominan los carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos antimicrobianos y vitaminas, condicionando las propiedades físico-químicas del suelo y suponiendo una importante fuente de nutrientes para las bacterias (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Esto conlleva a que las raíces y su entorno sean las regiones de las plantas en donde se encuentra un mayor número de microorganismos, habiéndose estimado 100 veces más bacterias en la rizosfera que en la tierra circundante (van Loon y Glick, 2004). Debido al gran interés suscitado por la riqueza microbiológica de estos hábitats, se han realizado diversos estudios sobre los factores que afectan al establecimiento de las comunidades microbianas en el suelo y en la rizosfera. Así, se ha descrito que las bacterias rizosféricas se seleccionan en gran medida a partir de las poblaciones presentes previamente en el suelo, por lo que no es de extrañar que se haya identificado el tipo de sustrato como el principal factor que afecta a la composición de la población microbiana (Tan *et al.*, 2003; Schreiter *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha demostrado que, cultivadas bajo las mismas condiciones abióticas, diferentes especies de plantas presentan microbiomas bien diferenciados (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015), indicando que el genotipo y el ciclo de crecimiento de la planta, que influyen cuantitativa y cualitativamente en la producción de los exudados, ejercen una fuerte presión selectiva sobre la composición de la microbiota rizosférica (Bais *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2009). Aunque el suelo es considerado uno de los ecosistemas más ricos de la tierra a nivel microbiano, llegando a albergar del orden de 10^3 - 10^6 bacterias por gramo de tierra (Roesch *et al.*, 2007), su diversidad a nivel de filo es escasa, siendo los filos más abundantes *Acidobacteria*,

Actinobacteria, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Roesch *et al.*, 2007; Fierer *et al.*, 2009). La diversidad microbiana se ve más comprometida según se aprecia una mayor influencia de la planta. Aunque los exudados radiculares favorecen un mayor crecimiento de la comunidad bacteriana en número, la diversidad se ve reducida respecto a la de la tierra libre de raíces siendo los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (principalmente *Beta* y *Gamma Proteobacteria*) los más abundantes en la ectorrizosfera (Eilers *et al.*, 2010; Bulgarelli *et al.*, 2013); en la endorrizosfera la especialización se hace más patente y la diversidad es aún menor, este compartimento se encuentra colonizado en un 80% por *Beta* y *Gamma Proteobacterias* (Gottel *et al.*, 2011). Estas investigaciones apoyan la idea de que la comunidad bacteriana, además de por el sustrato, se ve influenciada por las plantas que seleccionan su microbiota compatible (Bulgarelli *et al.*, 2013; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Santoyo *et al.*, 2016).

Existen varios modelos que explican los mecanismos de enriquecimiento y selección de las comunidades microbianas por la planta. Algunos autores han desarrollado un modelo de “dos pasos” que diferencia la microbiota asociada a la raíz (tanto en el rizoplasma como en la endorrizodermis) de la del suelo circundante (Bulgarelli *et al.*, 2013). En el modelo de enriquecimiento de “tres pasos” (Fig. 2) (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015), las plantas “reclutan” bacterias compatibles con su genotipo desde el reservorio de mayor diversidad microbiana que supone el suelo hasta la endorrizosfera siguiendo un gradiente de menor a mayor influencia del genotipo de la planta sobre las comunidades bacterianas. En este modelo se diferencian los siguientes pasos:

1. En la ectorrizosfera, la comunidad bacteriana endógena del suelo se va concentrando en número y su diversidad se ve restringida. Estas bacterias se ven influenciadas por gradientes de concentración de las sustancias excretadas por la raíz, por la disponibilidad de oxígeno y el pH.
2. En el rizoplasma se acentúa la selección de la comunidad microbiana en contacto directo con la superficie radicular y el genotipo de la planta tiene aquí una gran influencia sobre la compatibilidad de la interacción.

Por parte de las bacterias, la formación de *biofilms* y la adhesión a la raíz tienen una gran importancia.

3. La colonización de la endorrizosfera es llevada a cabo por una comunidad menos compleja, siendo bacterias del filo *Proteobacteria* las predominantes. Algunos factores bacterianos específicos como la movilidad o la capacidad de detoxificar ROS son requeridos para la colonización y la adaptación a este nicho ecológico, donde el genotipo de la planta tiene su mayor influencia en la selección de las especies bacterianas compatibles.

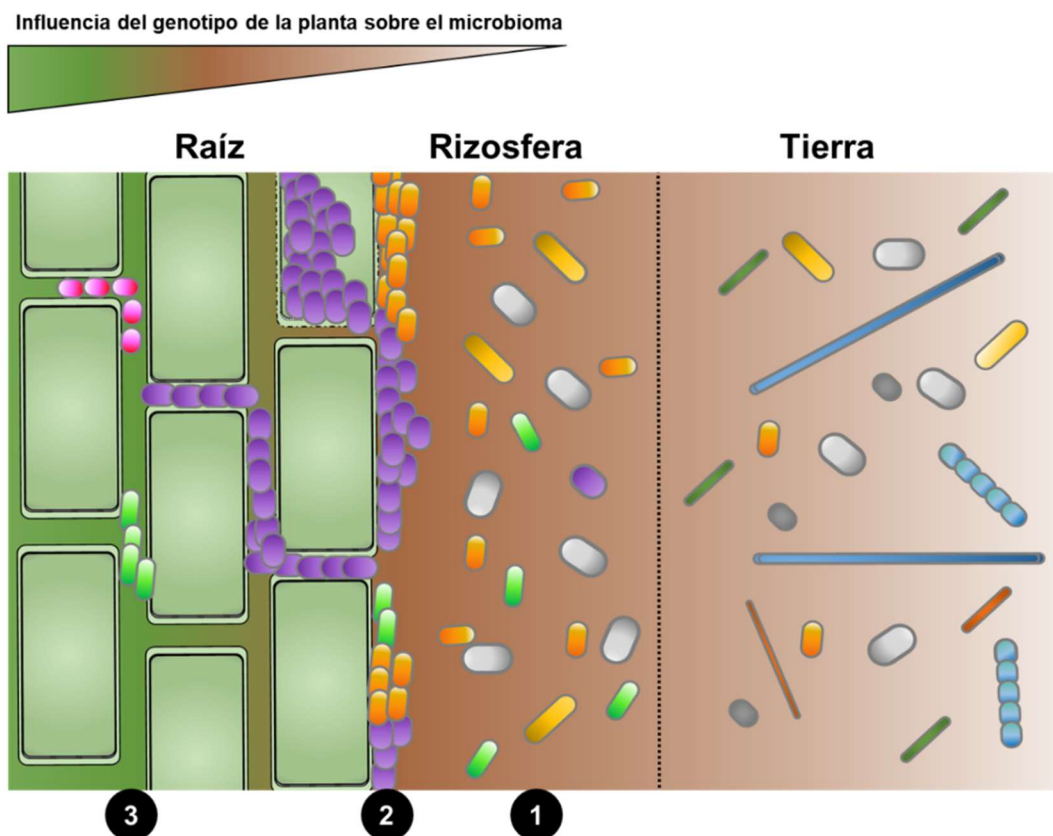


Figura 2. Esquema de la colonización bacteriana de las raíces siguiendo el modelo de enriquecimiento en tres pasos. En el suelo libre de raíces las comunidades microbianas se ven afectadas principalmente por el tipo de suelo, factores ambientales y la vegetación, siendo muy diversa su composición. En la ectorrizosfera (1) la influencia de la planta crea un gradiente de fuentes de carbono, pH y disponibilidad de oxígeno que afecta a la composición microbiana, menos diversa pero más concentrada que en el suelo libre de raíces, teniendo el genotipo de la planta una pequeña influencia. En el rizoplano (2) la comunidad bacteriana es seleccionada en parte por el genotipo de la planta y por factores bacterianos como la capacidad de adhesión, movilidad y quimiotaxis. La endorrizosfera (3) es colonizada por una comunidad menos compleja y especializada; en este compartimento el genotipo del hospedador tiene una gran influencia sobre las bacterias residentes que han de ser compatibles y resistir al sistema inmune vegetal. Adaptado de Reinhold-Hurek *et al.*, (2015).

2.2.- Bacterias endófitas

El término endófito se ha utilizado clásicamente para designar a aquellos hongos que habitan los tejidos internos de las plantas sin causar ningún efecto negativo a su hospedador. Solo a partir de los años 90 del pasado siglo se amplió el uso del término endófito a las bacterias colonizadoras de los tejidos internos vegetales (Chanway, 1996; Hardoim *et al.*, 2015). Durante los últimos 20 años la definición de bacteria endófitas más aceptada ha sido la dada por Hallmann y colaboradores en 1997 que definía como bacterias endófitas a “aquellas que pueden ser aisladas de un tejido vegetal desinfectado superficialmente o extraídas directamente del interior de la planta y que no causan efectos negativos visibles sobre el hospedador” (Hallmann *et al.*, 1997). Aunque la raíz ha sido el órgano donde más se ha estudiado el establecimiento de bacterias endófitas, éstas también pueden encontrarse en el interior de hojas, tallo, flores y frutos. En las partes aéreas de las plantas, la radiación UV, la reducción de nutrientes y los cambios drásticos de humedad/sequedad hacen que el número de bacterias localizadas en su superficie sea reducido. Por ello, la mayor parte de la comunidad endófitas se compone de bacterias provenientes de la raíz o de cepas muy adaptadas a la filosfera que pueda penetrar por los estomas, los hidátodos o pequeñas heridas producidas en la superficie de la planta (Compant *et al.*, 2010, 2011).

En los últimos años el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido la identificación de bacterias endófitas no cultivables cuyo papel en la interacción con la planta no puede ser descartado (Tian *et al.*, 2007; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Akinsanya *et al.*, 2015). Sin embargo, este tipo de análisis independiente de cultivos no permite discernir, en muchos casos, entre posibles patógenos por lo que recientemente se ha cuestionado la definición de bacteria endófitas y se ha propuesto orientarlo hacia el hábitat y no hacia la función que los microorganismos realicen en él (Hardoim *et al.*, 2015). Así, una bacteria endófitas sería aquella que durante su ciclo vital, o parte de él, es capaz de colonizar los tejidos vegetales internos (Hardoim *et al.*, 2015). Esta definición no hace distinción entre patógenos, patógenos oportunistas o PGPBs, aunque la mayoría de autores siguen reservando el término endófito para bacterias beneficiosas o bacterias que,

al menos en las condiciones estudiadas, no causen daño a la planta (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Gaiero *et al.*, 2013; Hardoim *et al.*, 2015).

La clasificación de los organismos endófitos tampoco se encuentra consensuada, siendo la más aceptada la que los clasifica según la relación que establecen con el hospedador durante su ciclo de vida. Atendiendo a ese criterio, las bacterias endófitas se han clasificado en tres grupos (Hardoim *et al.*, 2008; Gaiero *et al.*, 2013):

- Endófitos obligados: son aquellos incapaces de proliferar fuera de los tejidos vegetales. Normalmente se transmiten a través de las semillas o de vectores, como pueden ser hongos o insectos (Hardoim *et al.*, 2008). Han sido poco estudiados y muchos de los descritos son patógenos virulentos que, bajo determinadas condiciones, pueden permanecer asintomáticos como por ejemplo *Xylella fastidiosa* (Araújo *et al.*, 2002).
- Endófitos facultativos: son aquellos capaces de vivir en el suelo y colonizar las plantas de manera activa bajo determinadas circunstancias (Hardoim *et al.*, 2008), perteneciendo a este grupo la mayoría de los endófitos estudiados por sus propiedades promotoras del crecimiento de plantas. Principalmente pertenecen al filo *Proteobacteria* (Bulgarelli *et al.*, 2013).
- Endófitos pasivos: son aquellos que no son capaces de colonizar activamente la endorrizosfera pero pueden penetrar en tejidos vegetales de manera ocasional a través de heridas o zonas de elongación (Hardoim *et al.*, 2008), siendo muchas de estas especies poco competitivas a la hora de desarrollarse dentro de la planta y promover su crecimiento (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Se han descrito como endófitos pasivos algunos patógenos humanos, principalmente enterobacterias, para los cuales la endosfera de las plantas actúa como reservorio, pudiendo ser fuente de brotes epidémicos al llegar a la cadena alimentaria (Mendes *et al.*, 2013; van Overbeek *et al.*, 2014).

Aunque existen estudios sobre los mecanismos moleculares que rigen el establecimiento de la relación endófito-hospedador y cómo se interrelacionan ambos organismos una vez establecida la colonización endorrizosférica, aún falta mucha información para poder comprender dicho proceso en detalle. La mayoría de las investigaciones se han realizado con endófitos facultativos con potenciales propiedades promotoras del crecimiento vegetal, al ofrecer éstos una mayor facilidad de manejo en condiciones de laboratorio (Hardoim *et al.*, 2015). Si atendemos al modelo de colonización en tres pasos presentado anteriormente (Fig. 2), una gran proporción de las bacterias endófitas provienen de la rizosfera atraídas por los exudados radiculares (Compant *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2013; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Algunos autores han propuesto que la entrada de dichos endófitos potenciales desde la rizosfera al interior de las raíces se produce de manera pasiva a través de los poros que se generan en las zonas de crecimiento de los pelos radiculares (Mercado-Blanco y Prieto, 2012). Sin embargo, en otros casos se ha descrito que su entrada viene mediada de manera activa por enzimas tales como celulasas y β -glucanasas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). Muchas bacterias que logran migrar del rizoplasma a la exodermis radicular encuentran en las capas celulares que comprenden el córtex una barrera para llegar a colonizar la endodermis y así acceder a los haces vasculares que podrían repartirlas por el resto de tejidos de la planta. Por ese motivo su localización se observa preferentemente en los espacios intercelulares de las capas externas de la raíz y la colonización intracelular se reduce básicamente a la de las células vegetales dañadas (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Aquellas bacterias que logran traspasar la endodermis, ya sea utilizando perforaciones de la raíz por el desarrollo de raíces secundarias o por secreción de enzimas que degradan la pared celular vegetal, son transportadas a través del xilema a otros compartimentos vegetales (James *et al.*, 2002; Compant *et al.*, 2010). Así, las bacterias pueden llegar hasta los órganos reproductivos y los frutos en un proceso lento que puede durar varias semanas (Hardoim *et al.*, 2015). Por ejemplo, Compant y colaboradores (2008) estudiaron la colonización de la vid por parte de *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Para ello inocularon las bacterias en el sustrato de crecimiento de la planta y monitorizaron el desplazamiento de las bacterias desde el rizoplasma hasta las uvas mediante conteo de viables y

visualización de cortes con microscopía confocal. Los resultados mostraron que, aunque se pueden detectar bacterias en la endosfera una semana después de la inoculación, éstas no llegaron a colonizar el tallo (comprobado mediante la observación de bacterias en los haces vasculares del xilema) ni los frutos hasta la quinta semana. Estos resultados sirvieron, además, para confirmar que el xilema es utilizado para la colonización sistémica de la planta, refutando de esta manera ideas anteriores que afirmaban que sólo los organismos patógenos eran capaces de transportarse por los haces vasculares (McCully, 2001; Thorne *et al.*, 2006). No obstante, investigaciones como la anteriormente citada son escasas y se desconoce en gran medida la función específica de los endófitos en cada órgano que colonizan. La mayoría de estudios sobre las funciones realizadas por las bacterias endófitas se limitan a los endófitos de la raíz y serán detalladas en los siguientes apartados.

2.2.1.- Factores implicados en la colonización de la endorrizosfera por bacteris endófitas

La colonización efectiva de la raíz por bacterias endófitas implica la expresión coordinada de un buen número de factores génicos. La heterogeneidad existente entre las especies de bacterias endófitas conocidas y, una vez más, la falta de estudios exhaustivos en la materia, explican por qué se desconocen todavía muchos de los elementos implicados en el establecimiento de la colonización endorrizosférica y cómo interactúan estos determinantes bacterianos con la planta. Para intentar avanzar en el estudio de los genes implicados en la colonización de la endorrizosfera, en los últimos años se han realizado un número significativo de estudios comparativos de genomas de bacterianas endófitas (Hardoim *et al.*, 2008; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Mitter *et al.*, 2013; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Por ejemplo, Hardoim y colaboradores (2015) compararon 40 genomas de bacterias endófitas con los genomas de patógenos, bacterias de la rizosfera y rizobios con el objetivo de entender qué determinantes diferencian a los endófitos de otras bacterias que interactúan con plantas. En los siguientes apartados se comentan algunas propiedades que se consideran cruciales para el establecimiento bacteriano en la endorrizosfera.

Movilidad, quimiotaxis y adhesión

Como se ha comentado anteriormente, en la rizosfera los endófitos facultativos se ven atraídos hacia la raíz por los exudados de la planta (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Por ello, la movilidad bacteriana juega un papel importante en la colonización de la planta y, de hecho, la mayoría de los endófitos conocidos poseen flagelos (Mitter *et al.*, 2013). La quimiotaxis hacia la planta varía mucho entre las distintas especies de endófitos según el rango de hospedador predilecto de cada bacteria (Hardoim *et al.*, 2008). Así, estudios de comparación de genomas han revelado una gran variación en el número de genes *cheX* implicados en la respuesta quimiotáctica (Hardoim *et al.*, 2015). Por ejemplo, mientras que en *Gluconacetobacter diazotrophicus* se han descrito tan sólo 12 genes *cheX*, en *Azoarcus* sp. BH72 y en *B. phytofirmans* se han descrito más de 50 (Mitter *et al.*, 2013).

El flagelo se considera uno de los primeros factores bacterianos que entran en contacto con la planta, pudiendo activar la resistencia sistémica inducida (ISR) de ésta (Newman *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha visto que cuando *B. phytofirmans* coloniza como endófito el flagelo produce una pequeña reacción inmune en la planta que es menor que la respuesta que producen las bacterias patógenas de la vid (Trdá *et al.*, 2014). Experimentos realizados con *Azoarcus* sp. BH72 han demostrado también el papel del flagelo durante la colonización efectiva de las raíces de arroz sin que, en este modelo de interacción, se haya detectado la activación del sistema defensivo del arroz mediado por el flagelo (Buschart *et al.*, 2012).

Una vez que las bacterias han entrado en contacto con la raíz cobra especial importancia la adhesión y movilidad de tipo *twitching* mediada por los *pili* tipo IV (Hardoim *et al.*, 2008; Sheibani-Tezerji *et al.*, 2015). Al igual que en los estudios realizados con el flagelo, se demostró que la presencia de *pili* funcionales eran esenciales para la colonización del arroz por *Azoarcus* sp. BH72 (Böhm *et al.*, 2007; Shidore *et al.*, 2012). Para que la colonización sea exitosa es preciso que, tras la adhesión de las bacterias a la raíz, se formen microcolonias en la misma. Para la formación de microcolonias es esencial la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos (James *et al.*, 2002; Danhorn y Fuqua, 2007; Compant *et al.*,

2008). En este sentido, se ha demostrado el papel clave que el lipopolisacárido y el exopolisacárido tienen, respectivamente, en la colonización de raíces de arroz por *Herbaspirillum seropedicae* (Balsanelli *et al.*, 2013) y *G. diazotrophicus* (Meneses *et al.*, 2011).

Sistemas de secreción proteica

La secreción de proteínas efectoras desde la bacteria a la planta tiene un papel importante para modular el desarrollo de la interacción y producir cambios en la respuesta del hospedador hacia la bacteria (Tseng *et al.*, 2009). En bacterias Gram-negativas se han descrito seis sistemas de secreción que permiten la translocación de proteínas desde el citoplasma hacia el exterior en un solo paso, *i.e.*, los sistemas de secreción de tipo I (TISS), III (TIISS), IV (TIVSS) y VI (TVISS), o en dos pasos, transportándose primero al periplasma (por otras vías de secreción general) y después exportándose al exterior por los sistemas tipo II (TIISS) y V (TVSS) (Green y Mecsas, 2016). Empleando estos sistemas las bacterias secretan proteínas efectoras al hospedador que pueden (i) activar mecanismos de defensa, (ii) alterar las células hospedadoras para promover la colonización, o (iii) promover la nutrición de la bacteria (Torto-Alalibo *et al.*, 2009).

Aunque tradicionalmente se ha considerado importante la presencia de los TIISS, TIVSS y TVISS para las interacciones planta-bacteria (Tseng *et al.*, 2009), los estudios más recientes de genómica comparada no permiten llegar a un consenso claro sobre cuáles son los sistemas de secreción más relevantes, lo que es un reflejo de la gran diversidad genética existente entre los organismos endófitos (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Sessitsch *et al.*, 2012; Mitter *et al.*, 2013).

Detoxificación y enzimas relacionadas con estrés oxidativo

Como ya se ha descrito en anteriores apartados, durante las etapas de colonización vegetal los endófitos deben competir con otros microorganismos y resistir los mecanismos de defensa de las plantas, entre los que se encuentra un buen número de compuestos antimicrobianos. Para resistirlos, muchas bacterias endófitas presentan en su genoma una gran cantidad de genes que codifican bombas de extrusión capaces de translocar al exterior celular las sustancias

tóxicas. La mayoría de las bombas descritas son de tipo ABC, en bacterias Gram-positivas, y de tipo RND y MFS, en bacterias Gram-negativas (Martinez *et al.*, 2009; Mitter *et al.*, 2013).

Además, para poder sobrevivir en la endosfera las bacterias endófitas han tenido que desarrollar un sistema efectivo de detoxificación frente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que se originan en la planta como respuesta a una amplio rango de estreses bióticos y abióticos (Buonaurio, 2008; Hardoim *et al.*, 2015). Por ello, en los genomas de bacterias endófitas es común la presencia de genes que codifican catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas, hidroperóxido reductasas, óxido nítrico reductasa, tiorredoxin-oxidasas, glutatión peroxidasa o glutatión-S-transferasas (GST) en un número superior al que podemos encontrar en otras bacterias de la rizosfera, incluyendo fitopatógenos y rizobios (Hardoim *et al.*, 2008). En algunos casos esta especialización requiere la presencia de múltiples copias del gen que codifica una misma enzima implicada en la detoxificación. Por ejemplo, *B. phytofirmans* PsJN presenta 24 copias del gen que codifica la GST, un número muy superior al de otras especies de su género que viven en ambientes de elevado ROS, como por ejemplo aquéllas que viven en ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos y que presentan del orden de 18 copias (Mitter *et al.*, 2013).

2.3.- Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs)

Los mecanismos de promoción del crecimiento de plantas (PGP) han sido descritos principalmente en bacterias que habitan en la rizosfera, y se engloban en tres grandes grupos: fitoestimulación, biofertilización y biocontrol (Gaiero *et al.*, 2013). Un esquema de los principales mecanismos de promoción del crecimiento de plantas descritos en bacterias endófitas se muestra en la figura 3.

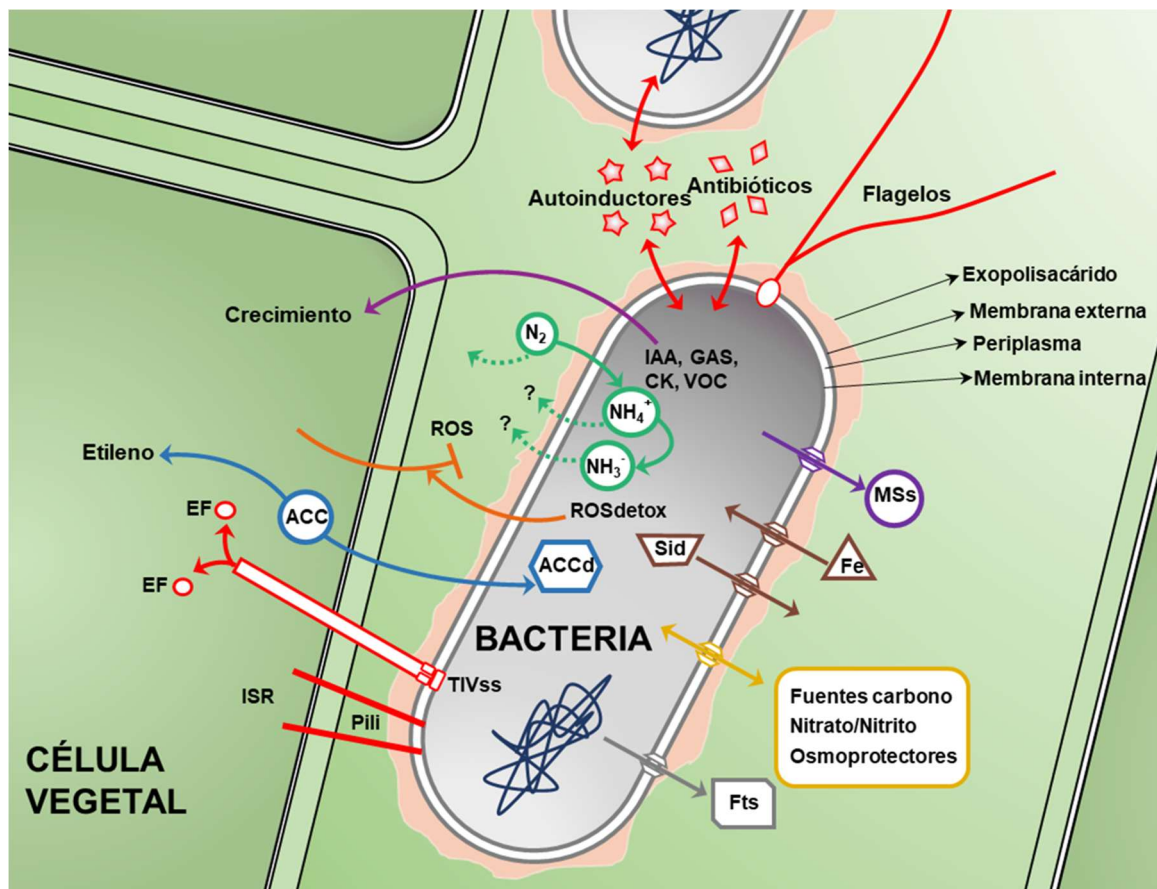


Figura 3. Esquema de algunos mecanismos PGP de las bacterias endófitas. Las bacterias endófitas se localizan frecuentemente en los espacios intercelulares de las células de la raíz. Se representan en rojo algunas estructuras y moléculas bacterianas que pueden desencadenar la respuesta de resistencia sistémica inducida (ISR) de la planta como los *pili*, flagelos, el exopolisacárido, el sistema de secreción de tipo IV (TIVSS) con la translocación de proteínas efectoras (EF) al citoplasma vegetal y la síntesis de autoinductores o antibióticos. En violeta se representan fitohormonas bacterianas como auxinas (IAA), giberelinas (GAS), citoquininas (CK), compuestos orgánicos volátiles (VOC) y otros metabolitos secundarios (MSs) que son transferidos al hospedador de manera inespecífica o desconocida. En azul se representa la modulación de los niveles de etileno (ET) de la planta por medio de la metabolización de su precursor, el ACC, por acción de la enzima bacteriana ACC desaminasa (ACCd). En naranja aparece esquematizada la capacidad de las enzimas bacterianas de detoxificación de ROS en la planta (ROSdetox) generado en respuesta a múltiples estreses bióticos y abióticos. En verde se muestra la capacidad de los endófitos diazotróficos para fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y producir amonio que debe ser activamente transportado al hospedador. La producción de sideróforos (Sid) y la toma de hierro (Fe) se ha representado en marrón. En gris se muestra la capacidad de secretar compuestos, e.g., fosfatasas (Fts), implicados en la solubilización de fosfatos inorgánicos. En el cuadro amarillo se muestran algunos sustratos para los cuales se ha detectado una inducción de los genes bacterianos que codifican los transportadores de membrana correspondientes. Adaptado de Hardoim *et al.*, (2015).

2.3.1.- Mecanismos de fitoestimulación

La fitoestimulación implica la promoción directa del crecimiento de la planta debido, principalmente, a la producción y modulación de fitohormonas (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Los mecanismos de fitoestimulación más estudiados están implicados en el metabolismo de auxinas, etileno, citoquininas y giberelinas.

Auxinas

El ácido indolacético (IAA) es la auxina más común y estudiada, de tal modo que en la literatura científica ambos términos se utilizan de forma genérica para referirse a esta fitohormona (Patten y Glick, 1996). Las auxinas son responsables de multitud de procesos fisiológicos en la planta, tales como la división y diferenciación celular, la germinación, el geotropismo, el desarrollo de raíces o la formación de raíces secundarias (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Además, la respuesta fisiológica de las plantas al IAA es muy sensible a la concentración y varía enormemente entre especies, órganos y estado de desarrollo (Glick, 2012), habiéndose demostrado que altas concentraciones de auxinas se correlacionan con un aumento de los niveles de etileno debido a la inducción de la síntesis de su inmediato precursor (Fig. 5) (Kim *et al.*, 1992). Del mismo modo, la aplicación exógena de IAA puede inhibir el crecimiento de las raíces (Pilet y Saugy, 1987) y, debido a este comportamiento dual dependiente de concentración, la adquisición por la planta de IAA exógeno producido por bacterias puede tanto estimular como suprimir el crecimiento de la planta (Glick, 2012). Se ha podido estimar que aproximadamente el 80% de las bacterias rizosféricas son capaces de producir IAA (Park *et al.*, 2017) y se ha sugerido su implicación en otras funciones diferentes a la estimulación directa del crecimiento de la planta, como por ejemplo la activación del sistema defensivo o como señal molecular de comunicación bacteriana (Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen y Vanderleyden, 2011; Glick, 2015).

Se han descrito, al menos, cinco rutas biosintéticas de IAA en bacterias, teniendo todas ellas como precursor principal al triptófano (Patten y Glick, 1996) (Fig. 4) y presentándose en muchos microorganismos múltiples rutas o partes de éstas, lo cual complica su caracterización y el estudio de su regulación (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Las rutas mejor caracterizadas son la de la indol-3-

acetamida (IAM) y la del indol-3-piruvato (IPA). La ruta IAM se ha descrito en un gran número de bacterias fitopatógenas productoras de elevadas cantidades de IAA (Jameson, 2000). La ruta IPA es la mejor caracterizada por ser la más abundante en plantas y haber sido descrita también en un amplio rango de microorganismos, principalmente en PGPBs y en cianobacterias. (Versées *et al.*, 2007).

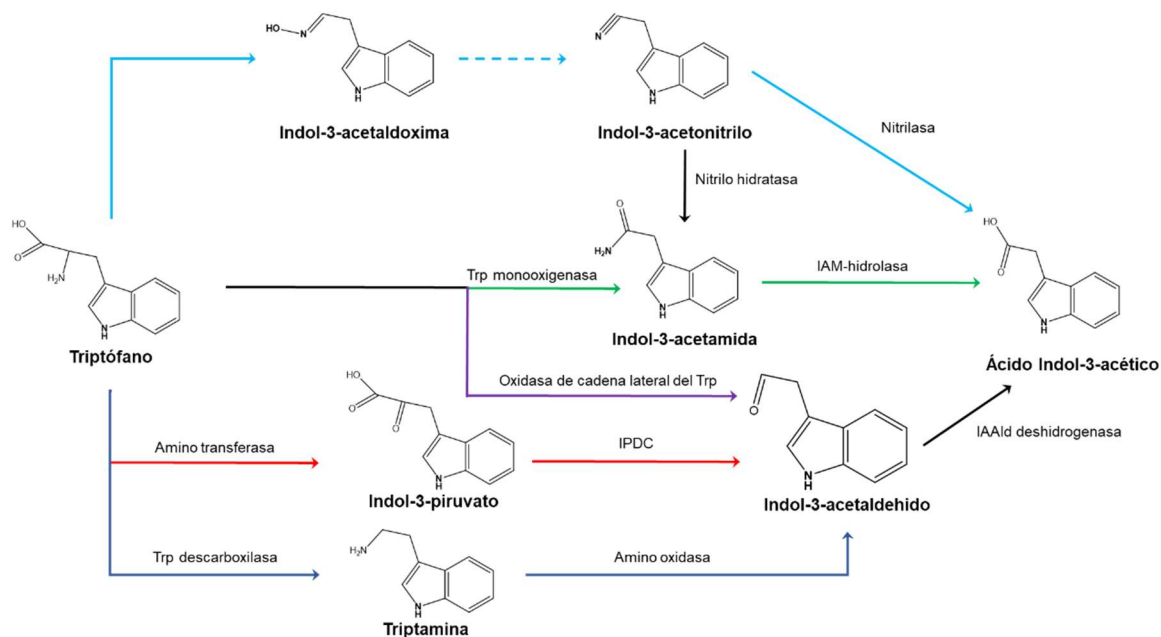


Figura 4. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de ácido indolacético (IAA) descritas en bacterias. Se han señalado con diferentes colores las reacciones específicas de las 5 rutas de biosíntesis de IAA a partir del triptófano caracterizadas en bacterias. En rojo se señala la ruta IPA (indol-3-piruvato); en verde la ruta IAM (indol-3-acetamida); en azul claro la ruta IAN (indol-3-acetonitrilo); en púrpura la ruta TSO (oxidasa de cadena lateral de Trp); y en azul oscuro la ruta TAM (triptamina). Adaptado de (Spaepen *et al.*, 2007).

Etileno

El etileno es un hidrocarburo gaseoso y una de las moléculas más simples que posee actividad biológica (Glick, 2012). Como fitohormona es activo a concentraciones tan bajas como 0,05 µl/l. El etileno está implicado en numerosas funciones durante todo el ciclo vital de la planta tales como el desarrollo inicial de las raíces, la maduración de frutos, el marchitamiento de las flores, la germinación de las semillas o la inhibición de la elongación (Abeles *et al.*, 1992). Además, el aumento de los niveles de etileno se ha asociado a la respuesta de la planta a un amplio rango de estreses tanto bióticos (presencia de microorganismos patógenos

e insectos) como abióticos (sequedad, humedad, metales pesados, radiación, contaminantes orgánicos) (Morgan y Drew, 1997). El incremento de etileno producido como respuesta a estos estreses puede ser muy perjudicial para el desarrollo de la planta. Inicialmente la respuesta consiste en un pequeño pico de etileno que activa los sistemas defensivos de la planta pero, si el estrés persiste, se produce un pico mayor de etileno que induce senescencia y clorosis, pudiendo provocar la inhibición temporal del crecimiento de la planta o, incluso, comprometer su supervivencia (van Loon *et al.*, 2006; Glick *et al.*, 2007).

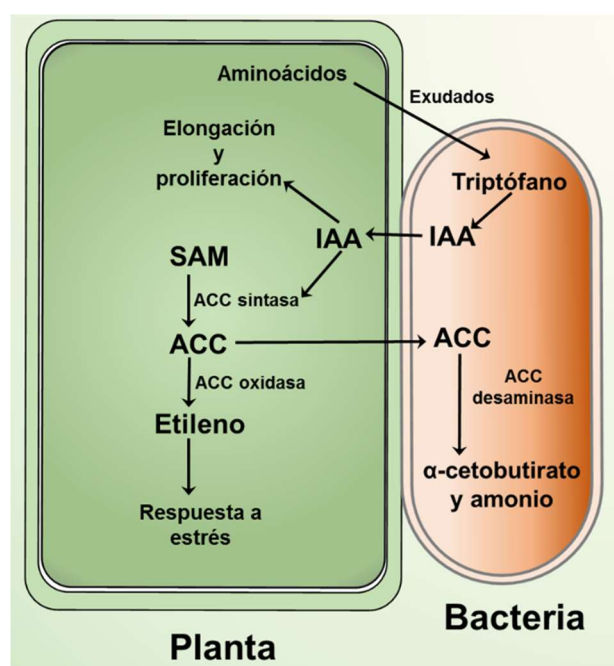


Figura 5. Modelo de acción e interrelación de la actividad ACC desaminasa y la producción de IAA bacteriano sobre la planta. La bacteria con actividad ACC desaminasa toma ACC de la planta y lo escinde en α -cetobutirato y amonio, reduciendo así los niveles de ACC y, por ende, de etileno, en la planta. La producción de ACC por la planta a partir de S-adenosil-L-metionina (SAM) puede verse inducida por la presencia de IAA que, a su vez, puede ser producido por la bacteria a partir de triptófano exudado por la raíz vegetal. Adaptado de Glick (2014).

En las plantas superiores, el etileno es sintetizado a partir de *L*-metionina, formándose los intermediarios S-adenosil-L-metionina (SAM) y 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (Yang y Hoffman, 1984). Muchas bacterias asociadas a plantas, y algunos hongos (Singh *et al.*, 2015), han desarrollado un sistema de modulación de los niveles de etileno en la planta mediante la síntesis de la enzima ACC desaminasa (Fig. 5) (Honma y Shimomura,

1978; Glick *et al.*, 1998) . Según dicho modelo, el ACC es exudado por las raíces de las plantas y transportado al interior de las bacterias, donde se induce la síntesis de la enzima ACC desaminasa que escinde el ACC a amonio y α -cetobutirato, que pueden ser utilizados por la bacteria como fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente. De este modo, el consumo de ACC por la bacteria reduce la cantidad de ACC disponible para su oxidación a etileno en la planta y, con ello, se disminuirán los niveles de etileno y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento vegetal.

Citoquininas y giberelinas

La producción de citoquininas, principalmente implicadas en la dominancia apical y en la división y diferenciación de las células vegetales (Kieber y Schaller, 2014), y de giberelinas, asociadas a multitud de funciones en la planta, *i.e.*, germinación de semillas, crecimiento longitudinal del tallo o inducción de la floración (Davière y Achard, 2013), ha sido descrita en varios géneros de bacterias residentes en suelo, especialmente en cepas con potencial PGP como *Azotobacter* spp, *Pseudomonas fluorescens* o *Bacillus subtilis* (Nieto y Frankenberger, 1989; Arkhipova *et al.*, 2005; Großkinsky *et al.*, 2016).

El conocimiento sobre cómo las bacterias productoras de estas fitohormonas afectan a las plantas hospedadoras es limitado, habiéndose descrito una mayor resistencia a estrés en plantas inoculadas con bacterias productoras de citoquininas y giberelinas (Bottini *et al.*, 2004; Arkhipova *et al.*, 2005). Sin embargo, existe un gran desconocimiento de los mecanismos moleculares de acción y producción de estas fitohormonas por PGPBs (Glick, 2012).

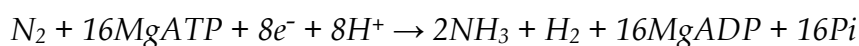
2.3.2.- Mecanismos de biofertilización

Se define como biofertilización la promoción del crecimiento de la planta derivado de un mayor acceso o suministro directo de nutrientes limitantes en el suelo (Bashan, 1998). Entre los mecanismos de biofertilización más estudiados destacan la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de sideróforos.

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial que las plantas demandan en grandes cantidades y que, en muchas circunstancias, se convierte en el principal factor limitante para su desarrollo. Esto se debe a que pese a ser el componente mayoritario de la atmósfera en su forma molecular (N₂), en el suelo sólo una pequeña fracción se encuentra biodisponible para las plantas, principalmente como nitrato (NO₃⁻) o amonio (NH₄⁺) (Nosrati *et al.*, 2014). El nitrógeno atmosférico sólo puede ser asimilado por algunos procariotas especializados, denominados diazotrofos, capaces de reducirlo a amonio en una reacción denominada fijación biológica del nitrógeno (BNF). Se han descrito microorganismos diazotróficos tanto en los dominios *Arquea* como *Bacteria* y, entre estas últimas, se distribuyen tanto en organismos simbioses (*Rhizobium* spp., *Frankia* spp.) como en bacterias de vida libre o endófitos facultativos asociadas a la rizosfera de plantas (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, etc.) (Santi *et al.*, 2013; Glick, 2015).

El complejo multienzimático clave en la BNF es el de la nitrogenasa. La reacción que cataliza la nitrogenasa se puede resumir en la siguiente ecuación estequiométrica (Franche *et al.*, 2009):



Las nitrogenasas más comunes en diazotrofos están compuestas por dos complejos enzimáticos (metaloproteínas) sensibles a oxígeno. El complejo I, también designado MoFe-proteína, está formado por un tetrámero (α:α:β:β) codificado por los genes *nifD* y *nifK*, al que se le unen dos grupos prostéticos denominados *P-clusters* (4Fe-4S) y dos cofactores FeMo (comúnmente denominados FeMoCo) a nivel del cual ocurre la reducción del N₂. El complejo II, designado Fe-proteína, es un homodímero (α:α) cuyas subunidades, codificadas por el gen *nifH*, están unidas por un único grupo prostético (4Fe-4S). El mecanismo enzimático de la fijación de nitrógeno requiere la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones, ferredoxinas o flavodoxinas también codificadas por genes *nif*, la transferencia de electrones a la MoFe-proteína

(dependiente de hidrólisis de MgATP) y la transferencia interna al FeMoco (Newton, 1997; Franche *et al.*, 2009).

Solubilización de fosfato

El fósforo es otro nutriente esencial para las plantas que sólo puede ser absorbido por las raíces en su forma soluble de ión fosfato (HPO_4^{2-} o H_2PO_4^-). Se estima que en la mayoría de las tierras de cultivo se encuentra fosfato en unas cantidades que rondan entre los 400 y 1200 mg/kg, pero sólo una pequeña fracción (<1 mg/kg) se encuentra biodisponible para las plantas (Nosrati *et al.*, 2014). Esto se debe a que en los suelos la mayoría de los fosfatos se presentan en formas insolubles, tanto orgánicas (fitatos y ésteres de fosfato), como inorgánicas (principalmente apatito) (Khan *et al.*, 2007). Por ello, la capacidad de solubilización y mineralización de estas especies fosfatadas por algunos microorganismos asociados a planta se ha considerado una característica deseable en las PGPBs (Goldstein, 1986; Rodríguez y Fraga, 1999).

Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la biodisponibilidad de los fosfatos. Por un lado, pueden secretar ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como el ácido glucónico y el ácido cítrico, que favorecen la solubilización de los fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999). Por otro lado, la mineralización de los ésteres fosfatados puede realizarse mediante la síntesis de varios tipos de fosfatasas que catalizan la rotura del enlace éster, liberando los grupos fosfato (Rodríguez y Fraga, 1999). Muchas bacterias son capaces de combinar ambas estrategias (Tao *et al.*, 2008).

Producción de sideróforos

A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, la forma predominante en ambientes aeróbicos es el ión férrico (Fe^{+3}), muy poco soluble a pH neutro, por lo que su asimilación por las plantas es muy lenta (Ma, 2005). Por otro lado, existe una alta demanda de hierro en hábitats como la rizosfera donde tanto los microorganismos como la planta compiten por tener acceso a este nutriente (Loper y Buyer, 1991). Para sobrevivir en estas condiciones, algunas bacterias son capaces de obtener hierro mediante la síntesis de sideróforos, moléculas quelantes de Fe^{3+} . Su modo de acción consiste en

transportar estas moléculas al exterior celular con el fin de unir Fe^{3+} , formándose el complejo Fe^{3+} -sideróforo que es reconocido por receptores específicos de membrana que permiten su transporte activo al citoplasma, donde es reducido a Fe^{2+} (Hider *et al.*, 2010). Asimismo, se ha descrito la capacidad de algunas plantas para incorporar el complejo Fe^{3+} -sideróforo y asimilar el Fe (Dimkpa *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2015).

La presencia de microorganismos productores de sideróforos en asociación con plantas se ha demostrado beneficiosa para éstas debido tanto al aumento de la biodisponibilidad total de hierro (mecanismo directo de biofertilización) como a la competencia por el hierro que dificulta el establecimiento de organismos patógenos (biocontrol) (Souza *et al.*, 2015).

2.3.3.- Mecanismos de biocontrol

El biocontrol realizado por bacterias de la rizosfera es un método indirecto de promoción del crecimiento de plantas consistente en la protección frente a la colonización por organismos patógenos (Gaiero *et al.*, 2013). El biocontrol se puede llevar a cabo mediante varios mecanismos:

Producción de compuestos antimicrobianos

En algunas PGPBs se ha estudiado su capacidad para sintetizar un amplio rango de compuestos antimicrobianos y enzimas líticas (quitinasas, celulasas, β -1,3-glucanasas, proteasas...) que les permite mejorar su competencia en la rizosfera y que están dirigidos, sobre todo, a evitar la proliferación de hongos fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha descrito la capacidad de síntesis de quitinasas en varias bacterias del género *Serratia* que impiden la germinación de esporas de hongos patógenos como *Botrytis cinerea* (Pawlowski y Sirrenberg, 2003), y la síntesis del compuesto fenólico antimicrobiano 2,4-diacetilfloroglucinol por *P. fluorescens* (Couillerot *et al.*, 2009).

Competencia

Existen evidencias que indican que la competición dentro del mismo nicho entre patógenos y PGPBs limita el establecimiento de los primeros. Tratamientos previos con PGPBs han evitado que la inoculación con organismos patógenos

causara daño sobre la planta (Glick, 2012). Por ejemplo, la inoculación previa con *Sphingomonas* spp. previno la aparición de síntomas de enfermedad tras la inoculación con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Innerebner *et al.*, 2011).

Inducción de la respuesta sistémica de la planta (ISR)

Durante la colonización de la planta, algunos determinantes bacterianos y metabolitos de las PGPBs pueden activar el mecanismo de defensa de la planta conocido como ISR, un mecanismo de defensa similar pero más moderado que la respuesta de las plantas a patógenos (respuesta sistémica adquirida, SAR) (Buonaurio, 2008). La señalización de la ISR se encuentra principalmente mediada por jasmonato y etileno, y puede ser inducida por el reconocimiento por parte de la planta de componentes bacterianos como el exopolisacárido, el lipopolisacárido, los *pili* o los flagelos. El beneficio de la inducción del ISR en respuesta a PGPBs se ha relacionado con un efecto cebador o de pre-alerta, de forma que las plantas serían capaces de reaccionar más rápida y eficientemente frente a un posible ataque de un organismo patógeno (Hardoim *et al.*, 2015).

3.- Papel del di-GMPc durante la interacción planta-bacteria

El (3'→5') di-GMP cíclico (di-GMPc) es un segundo mensajero universal en procariotas que controla numerosos procesos bacterianos. Por ejemplo, el di-GMPc es clave en el control de la transición de un estado planctónico móvil a un estado sésil que favorece el establecimiento de *biofilms*, y en la modulación de la virulencia, controlando el paso de un estado latente característico de infecciones crónicas a uno más virulento provocando infecciones agudas (Römling *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017). Algunos años después de su descubrimiento en 1987 se identificaron genes que codificaban enzimas encargadas de la síntesis y degradación del di-GMPc denominadas, respectivamente, diguanilato ciclasas (DGC) y di-GMPc fosfodiesterasas (PDE) (Tal *et al.*, 1998).

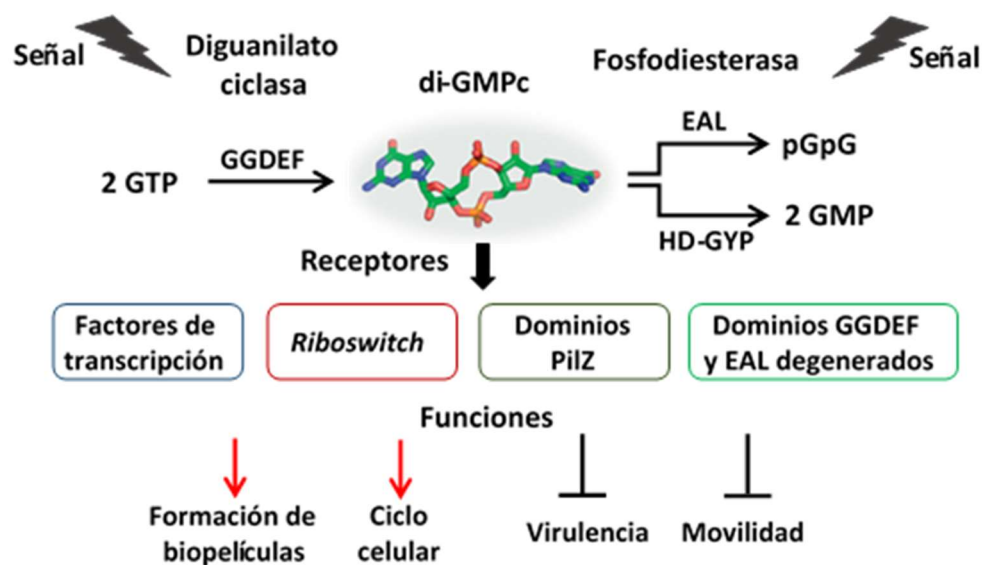


Figura 6. Diagrama que esquematiza la síntesis, degradación, mecanismo de acción y funciones celulares del di-GMPc. El di-GMPc se sintetiza por DGC que contienen motivos GGDEF, y se degrada por la acción de PDE que contienen los motivos EAL o HD-GYP. Estas actividades están moduladas por distintas señales ambientales. El di-GMPc es detectado por proteínas receptoras (factores de transcripción, proteínas con dominios PilZ, proteínas con motivos GGDEF y EAL degenerados) o RNAs (*riboswitch*) que interaccionan con su diana, alterando una función celular particular. Un aumento en los niveles de di-GMPc conlleva un aumento en la formación de *biofilms* y/o progresión en el ciclo celular (flechas rojas), y una disminución en los niveles de di-GMPc conlleva un incremento en la movilidad y/o virulencia (líneas negras). Adaptado de Martín-Moldes (2014).

La síntesis del di-GMPc se realiza a partir de dos moléculas de GTP (Fig. 6) y está catalizada por proteínas que poseen dominios DGC, que a su vez presentan motivos GGDEF altamente conservados. La degradación del di-GMPc está catalizada por enzimas que poseen dominios PDE y motivos conservados EAL, generándose un nucleótido lineal 5'-fosfoguanilil-(3'→5')-guanosina (5'pGpG) o HD-GYP, que rendirá finalmente dos moléculas de GMP (Krasteva *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017). Para ejercer su papel, el di-GMPc debe unirse a moléculas efectoras, habiéndose demostrado su actuación a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. Hasta la fecha se han identificado algunos motivos de interacción con el di-GMPc (Fig. 6), en ciertos factores de transcripción (siendo FleQ el más estudiado), en proteínas con dominios PilZ (secuencias consenso RxxxRx y (D/N)x(S/A)xxG)), dominios GGDEF y EAL degenerados (la unión de di-GMPc inhibe alostéricamente su actividad), y RNAs (actúan como *riboswitches* con capacidad de unir di-GMPc y controlar la expresión de algunos mRNA) (Römling *et al.*, 2013). No obstante,

recientemente se ha demostrado que el di-GMPc también puede unirse a proteínas que no presentan los dominios anteriormente mencionados, lo que complica la identificación mediante predicción bioinformática de los posibles efectores y el análisis de las rutas señalizadoras del di-GMPc (Martínez-Gil y Ramos, 2018).

En términos generales, se ha descrito que niveles altos de di-GMPc promueven la síntesis de exopolisacáridos, adhesinas y la formación de *biofilms* (Hickman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Borlee *et al.*, 2010; Liang, 2015), confieren morfología de colonia rugosa (Simm *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2009), desencadenan procesos de *quorum sensing* (Yrade *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2008) e inhiben la movilidad celular (Kazmierczak *et al.*, 2006; Wolfe y Visick, 2008; McCarter y Gomelsky, 2015; Skotnicka *et al.*, 2015) y la virulencia (Tischler y Camilli, 2005; Ryan, 2013). Sin embargo, el papel del di-GMPc en la virulencia no está completamente elucidado ya que parece depender en gran medida de la relación patógeno-huésped concreta y del estadio de la infección. Así, en algunas etapas se puede requerir la formación de *biofilms* y, por tanto, altos niveles de di-GMPc promoverían una infección crónica (Römling *et al.*, 2013).

Como se ha indicado anteriormente, el di-GMPc se encuentra implicado en la regulación de procesos celulares, como la movilidad o la adhesión, que son esenciales para una exitosa colonización de la planta por organismos endófitos. Sin embargo, al comienzo de esta Tesis Doctoral no se habían realizado estudios que relacionaran el di-GMPc con las bacterias endófitas y, en general, los trabajos realizados sobre el papel del di-GMPc en las interacciones planta-bacteria eran escasos. Los pocos estudios disponibles se han centrado, principalmente, en la regulación de la virulencia en bacterias fitopatógenas (Martínez-Gil y Ramos, 2018) como *P. syringae* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Aragón *et al.*, 2015), *Pseudomonas savastanoi* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014), *Xanthomonas campestris* (McCarthy *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2010; An *et al.*, 2014) o *Xanthomonas oryzae* (Zhang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), y en el estudio de la interacción entre plantas y bacterias simbiotes (Gao *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en estos estudios son dispares, por ejemplo, se ha observado que la sobreexpresión de la DGC PleD en las cepas fitopatógenas *P.*

syringae pv. *tomato* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* reduce la expresión del TIISS (asociado a patogénesis) pero sin afectar a la virulencia sobre el hospedador, mientras que la sobreexpresión de PleD en *P. savastanoi* no afecta a la expresión del sistema de secreción pero retrasa la aparición de necrosis (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Sin embargo, y al contrario de lo observado generalmente, altos niveles de di-GMPc en *X. fastidiosa* reducen la producción de exopolisacárido, lo que conlleva una disminución de la formación de *biofilm* y promueve la migración por los haces vasculares de la planta, aumentando la virulencia (Chatterjee *et al.*, 2010). En simbioses el estudio de cómo los niveles de di-GMPc afectan a las interacciones, por ejemplo, entre *Rhizobium etli* y *Phaseolus vulgaris* o entre *R. leguminosarum* y *Vicia sativa*, han demostrado que, en ambos casos, los altos niveles de di-GMPc favorecen la adhesión a las raíces de la planta, asociándose a una mayor formación de *biofilm*, pero afectan negativamente a estadios más tardíos, reduciéndose la fijación de nitrógeno y, por consiguiente, el crecimiento de la planta (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).

En resumen, todavía se conoce muy poco sobre el papel del di-GMPc en las interacciones planta-bacteria. Además, la cascada de señalización mediada por el di-GMPc se interconecta con otros sistemas de regulación bacterianos que implican otros segundos mensajeros nucleotídicos y otros mecanismos de regulación global, como el *quorum sensing*, también relacionados con la adaptación a nuevos ambientes (Srivastava *et al.*, 2011; Kalia *et al.*, 2013), lo que complica en gran medida el estudio de los circuitos reguladores que responden a cambios en los niveles de di-GMPc.

4.- Descripción de cepas endófitas en el género *Azoarcus*

En el apartado 1 de la Introducción se ha hecho referencia al género *Azoarcus* y a la existencia de dos grupos filogenéticos bien diferenciados según su especialización en la degradación de compuestos aromáticos o en su capacidad de residir como endófitos de gramíneas. Las características específicas de este último grupo serán desarrolladas a lo largo de este apartado.

Hasta la fecha se han descrito diez cepas del género *Azoarcus* capaces de interactuar con planta (Tabla 1), de las cuales se han secuenciado y publicado los genomas completos de *Azoarcus* sp. BH72 (Krause *et al.*, 2006) y *A. olearius* DQS-4 (Faoro *et al.*, 2017), mientras que se encuentra activo el proyecto de secuenciación de *A. communis* SWub3 (número de acceso: PRJNA234909).

Tabla 1. Cepas del género *Azoarcus* asociadas a planta.

Especie	Cepa	Aislamiento	Referencia
<i>Azoarcus indigens</i>	VB32	Base del tallo de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azoarcus indigens</i>	VW35a	Raíces de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azoarcus indigens</i>	VW34c	Raíces de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azoarcus indigens</i>	BS2-10	Esclerocio en campo de arroz, Pakistán	(Hurek, Wagner, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Azoarcus indigens</i>	OSP14-2	Raíces de arroz, Nepal	(Engelhard <i>et al.</i> , 2000)
<i>Azoarcus communis</i>	SWub3	Raíces de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azoarcus communis</i>	S2	Fangos de refinería de petróleo	(Laguerre <i>et al.</i> , 1987)
<i>Azoarcus communis</i>	LFN91	Raíces de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Engelhard <i>et al.</i> , 2000)
<i>Azoarcus olearius</i>	DQS-4	Suelo contaminado con petróleo, Taiwán	(Chen <i>et al.</i> , 2013)
<i>Azoarcus</i> sp.	BH72	Raíces de <i>L. fusca</i> , Pakistán	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)

A pesar de que la cepa *A. indigens* VB32 es considerada la cepa tipo del género (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993), la bacteria mejor caracterizada de este subgrupo del género *Azoarcus* es *Azoarcus* sp. BH72 que, además, es considerada una bacteria modelo para el estudio de la colonización endofítica de gramíneas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003; Faoro *et al.*, 2017). La cepa BH72 fue aislada, junto con cepas de *A. indigens* y *A. communis*, de la endorrizosfera de *L. fusca* en el Punjab, Pakistán, (Reinhold *et al.*, 1986), agrupándose todas ellas, de acuerdo al análisis del rDNA 16S, dentro de un nuevo género de β -Proteobacterias que se denominó *Azoarcus* debido a su morfología de bacilo curvado y a su capacidad para fijar nitrógeno (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). Desde entonces, el estudio de la interacción planta-bacteria por *Azoarcus* spp. se ha restringido, prácticamente, a la caracterización en profundidad de la cepa BH72 hasta que, a

principios de 2017, se publicaron las primeras investigaciones realizadas en *A. olearius* DQS-4 (Faoro *et al.*, 2017).

Se ha descrito la capacidad de *Azoarcus* sp. BH72 para colonizar *L. fusca*, arroz y sorgo (Hurek *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1997; Egner *et al.*, 1999), habiéndose centrado las investigaciones en la interacción con las dos primeras especies. La colonización de estas plantas por *Azoarcus* sp. BH72 sigue el esquema general explicado en el apartado 2.2 según el cual la bacteria es capaz de penetrar en la raíz a través de pequeñas fisuras en las zonas de crecimiento de raíces secundarias y zonas de elongación, colonizando todas las capas de la raíz, y pudiendo llegar a los tejidos aéreos a través del xilema (Hurek *et al.*, 1994). Se ha estimado que el número de bacterias colonizadoras puede llegar a alcanzar 10^{10} bacterias por gramo de raíz (peso seco) (Hurek *et al.*, 2002). También se ha demostrado su modesto potencial PGP al promover una ligera mejora en el crecimiento de plántulas de arroz (Hurek *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek y Hurek, 1997) y *L. fusca* (Hurek *et al.*, 2002). Además de la secuenciación del genoma de *Azoarcus* sp. BH72, se han realizado estudios transcriptómicos en respuesta a exudados de arroz que han ofrecido información de gran interés sobre los genes bacterianos implicados en la interacción con la planta (Shidore *et al.*, 2012). Así, se ha confirmado el papel fundamental de la movilidad y la adhesión bacteriana para conseguir una colonización efectiva, tal y como se ha comentado en el apartado 2.2.1, y se han identificado otros genes bacterianos implicados en la colonización de la planta. Por ejemplo, mediante la fusión transcripcional del gen reportero *gfp* al gen *nifH* se demostró la expresión de los genes de fijación de nitrógeno en la endorrizosfera (Egner *et al.*, 1998), lo que sugería que se podría estar produciendo la fijación de nitrógeno en las células que viven como endófito. Mediante la construcción de cepas mutantes en genes que codifican proteínas de los *pili* tipo IV (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006; Böhm *et al.*, 2007; Hauberg-Lotte *et al.*, 2012; Shidore *et al.*, 2012), del flagelo (Buschart *et al.*, 2012), o en el gen *eglA* que codifica una endoglucanasa (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006), se demostró el papel fundamental que dichos genes juegan durante la colonización endofítica, ya que se observó una reducción en la colonización de la planta en los mutantes generados. Además, en la cepa BH72 se han identificado otros factores implicados en la interacción con planta, como por ejemplo un mecanismo de *quorum sensing*

independiente de *N*-acil-homoserina lactonas (Hauberg-Lotte *et al.*, 2012), o el papel del TVISS (Dinse, 2014).

Respecto a la cepa *A. olearius* DQS-4, la secuenciación de su genoma ha revelado que comparte más de un 98% de identidad de secuencia de nucleótidos con *Azoarcus* sp. BH72, habiéndose propuesto la inclusión de ésta última cepa dentro de la especie *A. olearius* (Faoro *et al.*, 2017). *A. olearius* DQS-4 comparte todos los genes anteriormente mencionados que han sido relacionados con la interacción de la cepa BH72 con la planta y, además, se ha descrito una región del genoma, que está ausente en la cepa BH72, implicada en la producción de sideróforos (Faoro *et al.*, 2017). Los estudios *in planta* con *A. olearius* DQS-4 se restringen a experimentos de colonización llevados a cabo en arroz y en almorejo (*Setaria viridis*, gramínea de tipo C4). En dichas plantas, la cepa DQS-4 es capaz de colonizar tanto la raíz como las partes aéreas, habiéndose recuperado hasta 10¹⁰ UFC por gramo de raíz (peso fresco) y de promover el crecimiento de las plantas (Faoro *et al.*, 2017).

4.1.- Identificación de genes relacionados con un estilo de vida endófito en *Azoarcus* sp. CIB

El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015) permitió la búsqueda e identificación *in silico* de genes ortólogos a los que previamente habían sido relacionados con un estilo de vida endófito en otras bacterias (Tabla 2). Así, se pudo constatar que *Azoarcus* sp. CIB dispone de: genes necesarios para la fijación biológica del nitrógeno; varios *clusters* (no contiguos) para la síntesis de *pili* tipo IV y flagelo; genes *che* relacionados con quimiotaxis, que podrían desempeñar un papel fundamental detectando moléculas presentes en los exudados radiculares; varios *clusters* responsables de la síntesis de lipopolisacárido y exopolisacárido y tres sistemas de secreción proteica diferentes (TISS, TIVSS y TVISS).

Introducción

Tabla 2. Genes de *Azoarcus* sp. CIB con posibles funciones relacionadas con la interacción con planta

Función	Determinante bacteriano	Genes
Movilidad y quimiotaxis		
	Pili tipo IV	AzCIB_3113-3119 (<i>pil</i>) AzCIB_3883-3887 (<i>pil</i>) AzCIB_4164-4168 (<i>pil</i>)
	Flagelo	AzCIB_0942-0980 (<i>fli/flg</i>) AzCIB_3163-3166 (<i>flh/mot</i>) AzCIB_3563-3571 (<i>flh/mot</i>)
	Quimiotaxis	AzCIB_3156-3162 (<i>che</i>) AzCIB_2334-2346 (<i>cheII</i>)
Adhesión a planta		
	Lipopolisacárido	AzCIB_0492-0512 (<i>waa</i>)
	Exopolisacárido	AzCIB_0813-0833 (<i>gum/eps</i>) AzCIB_1833-1852 (<i>eps</i>) AzCIB_3666-3696 (<i>eps</i>)
	Material capsular	AzCIB_3821-3842 (<i>cap</i>)
Resistencia a estrés osmótico		
	TMAO	AzCIB_2135-2138 (<i>tor</i>)
	Poliaminas	AzCIB_2142-2145 (<i>pot</i>)
	Sarcosina	AzCIB_2129-2132 (<i>sox</i>)
Sistemas de secreción		
	Tipo II	AzCIB_3345-3352 (<i>gsp</i>)
	Tipo IV	AzCIB_4451-4465 (<i>tra</i>)
	Tipo VI	AzCIB_2563-2587 (<i>tra</i>)
Biofertilización		
	Fijación de N ₂	AzCIB_0675-0715 (<i>nif/rffl</i>)

Adaptada de (Martín-Moldes *et al.*, 2015).

Todos estos análisis planteaban la posibilidad de que *Azoarcus* sp. CIB fuese capaz de interaccionar con plantas de forma similar a como ya se había descrito para los miembros del subgrupo de *Azoarcus* endófitos. No obstante, y dada la gran complejidad de mecanismos implicados en la interacción planta-bacteria, el análisis *in silico* del genoma de una bacteria no permite predecir con garantía si dicha cepa es capaz o no de interaccionar con la planta. Por ello, resultaba crucial la realización de abordajes experimentales que permitiesen confirmar la interacción *Azoarcus* sp. CIB-planta. La demostración del estilo de

vida endófito en *Azoarcus* sp. CIB permitiría proponer a esta cepa como la primera bacteria del subgrupo de *Azoarcus* especializados en degradación anaeróbica de compuestos aromáticos capaz de adaptarse a un estilo de vida endófito, confirmando el potencial de *Azoarcus* sp. CIB como bacteria generalista con una amplia capacidad de adaptación a diferentes nichos ecológicos y condiciones ambientales.

5.- Resistencia bacteriana a metales pesados

Los metales y metaloides constituyen aproximadamente el 75% de los elementos químicos conocidos y están distribuidos de forma ubicua en la biosfera. Algunos metales y metaloides, e.g. Na, K, Mg, Ca, V, Mo, Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn o Se, son esenciales para la vida (Maret, 2016) y la mayor parte de las proteínas dependen de cofactores metálicos para su correcta estructura y/o funcionamiento (Lemire *et al.*, 2013; Chandrangu *et al.*, 2017). Por otro lado, los metales y metaloides son imprescindibles en numerosos procesos industriales y, por consiguiente, en nuestra vida diaria (Gadd, 2010). Como consecuencia de la actividad antropogénica industrial los metales se han redistribuido en el ambiente, acumulándose en un gran número de hábitats terrestres y acuáticos, y pudiendo producir efectos adversos sobre la biota y la salud humana (Tchounwou *et al.*, 2012). Atendiendo a su elevada concentración en algunos ambientes, 13 metales y metaloides han sido clasificados como contaminantes prioritarios: Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, Zn (Sparks, 2007). A pesar de su toxicidad, muchas bacterias han desarrollado una gran variedad de mecanismos de resistencia, lo que les permite proliferar en lugares contaminados con metales y metaloides (Gadd, 2010).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a metales y metaloides se basan principalmente en dos estrategias: (i) cambios en la especiación del metal, promoviendo su movilización o inmovilización, lo que incluye transformaciones redox, la producción de péptidos y proteínas que unen metales (metalotioneinas) y la precipitación por unión a materia orgánica e inorgánica (Gadd, 2010); y (ii) expulsión del metal al exterior celular utilizando bombas de extrusión (Nies, 2003).

Uno de los mecanismos de movilización de metales más estudiado es la resistencia a mercurio mediada por los genes *mer* que codifican las enzimas responsables de la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 volátil (Barkay *et al.*, 2003). La proteína MerA cataliza la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 . Otros componentes del operón *mer* son el regulador transcripcional MerR, una proteína periplásmica de unión a Hg^{2+} (MerP) y la proteína de membrana (MerT) que une Hg^{2+} en el periplasma y lo transporta al citoplasma para su reducción. Tras la reducción del ion Hg^{2+} , el Hg^0 volátil difunde a través de la pared celular al exterior. La movilización de metales mediante volatilización también se ha estudiado, por ejemplo, en otros metales como el Cd o el Pb, o en metaloides como el As, el Se o el Te, que pueden ser metilados, siendo estas formas metiladas muy volátiles. No obstante, estos sistemas de resistencia pueden suponer un riesgo para la salud debido a que algunas formas metálicas metiladas son altamente tóxicas (Pongratz y Heumann, 1999; Ranjard *et al.*, 2002; Yang y Rosen, 2016).

Entre los mecanismos de inmovilización de metales ampliamente estudiados se incluye la enzima Cu-oxidasa periplásmica, CueO, que oxida Cu^{1+} a Cu^{2+} . En este caso la oxidación del Cu^{1+} es un proceso de detoxificación, ya que se produce una variante de cobre que es menos tóxico y con menor capacidad de entrada en el citoplasma (Bondarczuk y Piotrowska-Seget, 2013). Otros mecanismos de resistencia que incluyen cambios redox y/o inmovilización son la reducción extracelular de Cr^{6+} a Cr^{3+} , que impide su entrada en la célula (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008); la quelación de iones metálicos mediante la producción de sideróforos, *e.g.*, la pioverdina producida por *P. aeruginosa* es capaz de quelar, además de hierro, Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^+ y Zn^{2+} (Schalk *et al.*, 2011), o la adsorción a los exopolisacáridos bacterianos, *e.g.*, los exopolisacáridos de cianobacterias como *Anabaena spiroides* que son utilizados para la biosorción de Mn^{2+} o Pb^{2+} (Gupta y Diwan, 2017).

La expulsión o extrusión al medio representa el principal mecanismo de resistencia general a metales pesados en bacterias. Este mecanismo está basado en la presencia en las membranas bacterianas de una batería de transportadores dependientes de energía, de forma que los iones metálicos que entran al

citoplasma o periplasma son bombeados de nuevo hacia el exterior (Nies, 2003). Se han documentado cuatro tipos de bombas de extrusión de metales (Fig. 7): (i) las ATPasas de tipo P; (ii) los transportadores de tipo CBA; (iii) los transportadores CHR y (iv) los transportadores de tipo CDF (Nies, 2003).

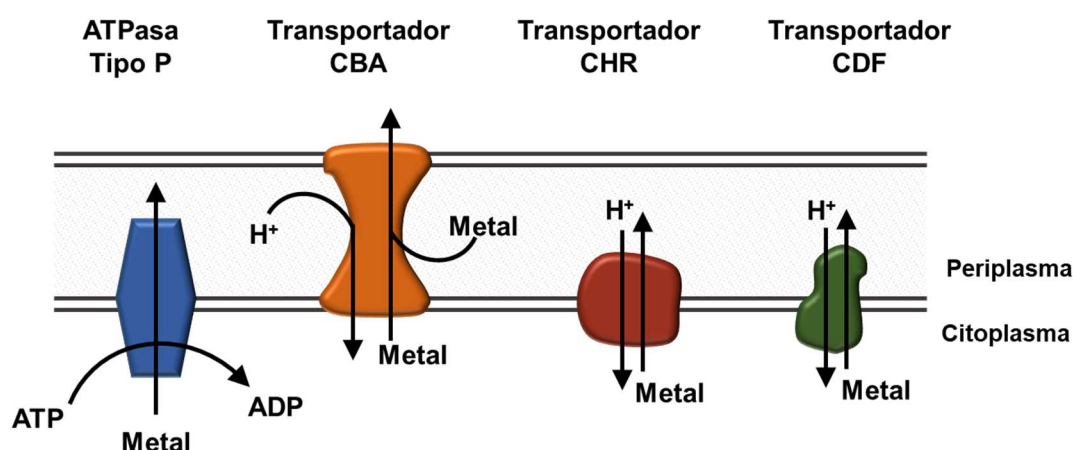


Figura 7. Principales familias de transportadores implicados en la resistencia a metales pesados en bacterias Gram-negativas. Los transportadores ATPasa de tipo P acoplan el bombeo de los sustratos desde el citoplasma al periplasma a la hidrólisis de ATP. Los transportadores CBA abarcan toda la envuelta celular de bacterias Gram-negativas y expulsan los metales tanto del periplasma como del citoplasma utilizando la energía del gradiente quimiosmótico. Los transportadores CHR exportan cromato del citoplasma al periplasma utilizando la energía proporcionada por la fuerza protón-motriz. Los transportadores CDF utilizan la fuerza protón-motriz para expulsar iones metálicos desde el citoplasma al periplasma.

Las ATPasas de tipo P constituyen una superfamilia de transportadores que movilizan cationes inorgánicos, principalmente H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} o Pb^{2+} , a través de las membranas celulares desde el citoplasma hacia el periplasma mediante la energía obtenida de la hidrólisis de ATP (Nies, 2003). El subgrupo de las ATPasas de tipo P_{1B} tiene especial importancia en la resistencia bacteriana a metales, al transportar específicamente cationes de Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Pb^{2+} (Argüello, 2003). Estas ATPasas se encuentran intercaladas en la membrana citoplásmica y presentan tres dominios conservados: (i) el dominio transmembrana que suele presentar entre 6-8 hélices transmembrana que se encargan del transporte del sustrato; (ii) el dominio de unión a ATP, encargado de generar la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis del ATP y (iii) el dominio activador encargado de la defosforilación (Smith *et al.*, 2014).

Los transportadores de tipo CBA pertenecen a la familia de transportadores RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*) y están formados, principalmente, por un complejo proteico de tres componentes (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999): (i) la propia proteína de tipo RND localizada en la membrana interna; (ii) una proteína periplásmica MFP (*Membrane Fusion Protein*) (Andersen *et al.*, 2001); (iii) una proteína OMF (*Outer Membrana Factor*) que forma el canal transmembrana para el transporte del catión (Johnson y Church, 1999). En conjunto forman un complejo de extrusión capaz de exportar directamente al exterior celular iones metálicos desde el citoplasma y/o el periplasma (Nies, 2003). Este sistema de extrusión también es utilizado por las bacterias para expulsar los iones metálicos presentes en el periplasma como consecuencia de la acción de otros sistemas de extrusión tales como los transportadores ATPasa de tipo P, los CHR o los CBF. Los sistemas de transporte CBA mejor caracterizados son: (i) el complejo CzcCBA de la β -proteobacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 relacionado con la resistencia a Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} que permite la extrusión de estas formas iónicas al exterior celular mediada por la energía procedente de la fuerza protón-motriz (Nies, 1995, 2003); y (ii) el complejo CusCFBA de *Escherichia coli* relacionado con la resistencia a Cu^+ y Ag^+ que, además de las proteínas estructurales de la bomba de extrusión CBA, contiene una proteína accesoria, denominada CusF, localizada en el periplasma y que se une al metal (Delmar *et al.*, 2015).

Los transportadores CHR pertenecen a una superfamilia de transportadores de cromo presentes en los tres dominios de la vida (Díaz-Pérez *et al.*, 2007). En bacterias, el gen *chrA* codifica una proteína transmembrana que permite la exportación de cromo del citoplasma al periplasma utilizando la fuerza protón-motriz (Jiménez-Mejía *et al.*, 2006; Viti *et al.*, 2014).

Por último, los transportadores CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) están principalmente asociados a la homeostasis celular ya que pueden actuar tanto para exportar como para importar metales. En bacterias se ha documentado su implicación en el transporte de un amplio rango de metales, incluyendo Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} o Cd^{2+} (Nies, 2003) empleando la fuerza protón-motriz para el transporte del ion metálico al periplasma (Haney *et al.*, 2005).

Debido a que en esta Tesis Doctoral se va a tratar principalmente la resistencia bacteriana a selenio, telurio y arsénico, en los siguientes apartados se detallarán los mecanismos de resistencia conocidos a estos metaloides.

6.- Resistencia bacteriana a metaloides: selenio y telurio

6.1.- Resistencia a selenio

El selenio es un metaloide perteneciente al grupo de los calcógenos que fue descubierto en 1818 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Aunque en un principio fue conocido por sus propiedades tóxicas, más tarde se demostró que era esencial para todos los organismos a bajas dosis, por lo que no es extraño que se le conozca como la “toxina elemental” (Heider y Böck, 1993). El selenio mantiene una gran analogía química con el azufre por lo que su toxicidad es debida, en gran medida, a su capacidad para sustituirlo, dañando así las propiedades bioquímicas de las moléculas y enzimas en las que lo sustituye (Staicu *et al.*, 2017).

En la naturaleza el selenio puede encontrarse en cuatro estados de oxidación diferentes: selenato (Se^{6+}), selenito (Se^{4+}), selenio elemental (Se^0) y seleniuro (Se^{2-}) (Stolz *et al.*, 2006). Además de formar parte de compuestos inorgánicos, el selenio puede encontrarse con frecuencia asociado a compuestos orgánicos tales como los aminoácidos selenometionina y selenocisteína o a compuestos metilados volátiles como el dimetil seleniuro (DMSe) y el dimetil diseleniuro (DMDSe) (Stolz *et al.*, 2006). La forma más reactiva y tóxica es el Se^{2-} que rápidamente puede oxidarse a Se^0 , siendo la forma metálica relativamente poco tóxica, o bien puede combinarse en las formas orgánicas anteriormente mencionadas que presentan una toxicidad mucho menor que el radical Se^{2-} . Los oxianiones Se^{6+} y Se^{4+} , son los más abundantes y generalmente son tóxicos para los organismos a concentraciones de ppm. Estas formas oxianiónicas del Se pueden ser detoxificados mediante su reducción a Se^0 (Zannoni *et al.*, 2008).

Desde principios del siglo XX se conoce la capacidad de algunas bacterias para interactuar e incorporar especies de selenio a su metabolismo, siendo la

primera reseña la de un organismo autótrofo capaz de generar energía a partir de selenio (Lipman y Waksman, 1923). Más tarde se documentó la capacidad de oxidación de selenio a selenito por la bacteria heterótrofa *Bacillus megaterium* (Sarathchandra y Watkinson, 1981). Los procesos de utilización de selenio como fuente de energía se demostraron posteriormente que eran muy ineficientes (Stolz *et al.*, 2006). En las últimas décadas ha aumentado el interés por el estudio de los mecanismos de resistencia a oxianiones de selenio en bacterias. La resistencia a selenato o selenito se lleva a cabo en una reducción secuencial: $\text{Se}^{6+} \rightarrow \text{Se}^{4+} \rightarrow \text{Se}^0 \rightarrow \text{MetSe}^{2-}$, en la que los elementos moleculares implicados todavía son desconocidos. Muchas de las investigaciones se han centrado en el estudio de la capacidad de algunas bacterias para acoplar la detoxificación de Se^{6+} y Se^{4+} a la producción de nanopartículas de selenio elemental (SeNPs) que pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones tecnológicas (Dhanjal y Cameotra, 2010; Prasad *et al.*, 2012; Correa-Llantén *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Tugarova y Kamnev, 2017; Wadhvani *et al.*, 2018). Por otro lado, la metilación de selenio como mecanismo de detoxificación se conoce desde hace décadas debido a la observación de que los organismos expuestos a selenio desprendían un fuerte olor similar al ajo que fue relacionada con la formación de compuestos metilados de selenio (Zannoni *et al.*, 2008). Estas especies metiladas se forman por la reducción del Se^0 y de compuestos orgánicos como la selenometionina, siendo el DMSe y DMDSe los derivados metilados que se forman con mayor frecuencia (Stolz *et al.*, 2006). La metilación es un mecanismo de detoxificación muy extendido entre bacterias y que implica a enzimas metiltransferasas (Heider y Böck, 1993; Chasteen y Bentley, 2003) tales como la proteína TpmT, una S-tiopurina-metil-transferasa capaz de metilar Se^0 a DMSe y DMDSe (Ranjard *et al.*, 2002, 2003).

La reducción de oxianiones de selenio en bacterias puede no ser solamente un mecanismo de detoxificación sino que puede también estar ligado a mecanismos respiratorios o de obtención de energía, (Stolz *et al.*, 2006), pudiendo llevar acoplada la formación de SeNPs intracelulares o extracelulares (Oremland, Herbel, *et al.*, 2004). La respiración de selenato fue descrita por primera vez en bacterias anaeróbicas presentes en sedimentos (Oremland *et al.*, 1989) y, desde entonces, se han descrito aislados con capacidad para utilizar el selenato como

aceptor final de electrones en todo el dominio Bacteria (Nanchaiah y Lens, 2015). Sin embargo, el mecanismo molecular de reducción de Se^{6+} solo se ha caracterizado hasta la fecha en unas pocas especies bacterianas. Así, la selenato reductasa (SerABC) mejor caracterizada es la de *Thauera selenatis* (Butler *et al.*, 2012). Se trata de un heterotrímero formado por las subunidades SerA, SerB y SerC, siendo la subunidad catalítica SerA una molibdoenzima perteneciente a la familia de las dimetilsulfóxido (DMSO) reductasas que reduce selenato a selenito en el periplasma (McEwan *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2012). En *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 se ha identificado un operón *srdABC* que codifica una selenato reductasa con una estructura similar a la de *T. selenatis*, siendo un trímero formado por las subunidades SrdA, SrdB y SrdC, pero con importantes divergencias al estar ligada a membrana y encontrarse filogenéticamente más cercana a las tetrionato reductasas que a la enzima SerABC de *T. selenatis* (Kuroda *et al.*, 2011).

La reducción de selenito a Se^0 puede ocurrir de forma independiente o secuencial a la previa reducción de Se^{6+} a Se^{4+} . Aún se desconoce si hay una enzima específica responsable de la reducción del selenito a Se^0 que, además, suele ir ligada a la formación de SeNPs (Oremland, Herbel, *et al.*, 2004). La descripción de SeNPs fue realizada por primera vez en 1974, cuando se localizaron depósitos de selenio en las membranas de *E. coli* C-90 (Gerrard *et al.*, 1974). Desde entonces, se ha reportado la acumulación de SeNPs intracelulares, periplásmicas o extracelulares en un alto número de organismos, tanto eucariotas como procariotas (Nanchaiah y Lens, 2015). Aunque, como se ha apuntado anteriormente, hasta la fecha no se ha identificado ninguna enzima específica responsable de la actividad selenito reductasa, se ha sugerido que la reducción inespecífica de Se^{4+} a Se^0 puede estar mediada por cuatro mecanismos bioquímicos diferentes, que pueden acontecer tanto en el citoplasma como en el periplasma (Zannoni *et al.*, 2008):

1. Reacción de Painter que implica la reducción del Se^{4+} mediante grupos tiólicos reducidos. El selenito es altamente reactivo frente a los grupos tiólicos de la célula, reaccionando especialmente con glutatión y tiorredoxinas, formándose Se^0 y ROS que provoca un aumento del estrés

- oxidativo en las células en presencia de oxianiones de selenio (Kessi y Hanselmann, 2004).
2. Reducción enzimática de oxianiones de selenio por oxidorreductasas del periplasma o del citoplasma. Las principales enzimas que se han descrito en procesos que implican la reducción biológica inespecífica de selenito han sido las nitrato reductasas, en cepas como *Ralstonia eutropha* y *Paracoccus denitrificans* (Sabaty *et al.*, 2001), la nitrito reductasa en *Rhizobium sllae* (Basaglia *et al.*, 2007) y *T. selenatis* (Debieux *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012), o la fumarato reductasa en *Shewanella oneidensis* MR-1 (Li *et al.*, 2014).
 3. Reacciones inorgánicas con metabolitos bacterianos. Por ejemplo, se ha descrito la reducción de Se^{4+} a Se^0 a partir del sulfuro producido durante la reducción bacteriana del sulfato (Hockin y Gadd, 2003).
 4. Reacción redox del Se^{4+} con el sideróforo ácido piridín-2,6-bistiocarboxílico (PDTC) (Zannoni *et al.*, 2008). El PDTC producido por *Pseudomonas stutzeri* y *P. putida*, tiene la habilidad de unirse a un amplio rango de metales (Cortese *et al.*, 2002) y en presencia de Se^{4+} puede formar Se^0 y PDA (ácido piridin-2,6-biscarboxílico) (Zawadzka *et al.*, 2006).

El Se^0 formado tras la reducción del selenito es insoluble y puede presentar estructuras amorfas o cristalinas caracterizadas por su color rojizo o gris, respectivamente. Las SeNPs tienen un gran interés industrial debido a su capacidad semiconductora y a sus propiedades fotovoltaicas y fotoconductoras, por lo que es utilizado en la industria en multitud de aplicaciones, incluyendo la fabricación de paneles fotovoltaicos, la fotografía o la reprografía. Las SeNPs también son de gran utilidad en medicina como antioxidante, antimicrobiano e incluso en la prevención del cáncer (Tinggi, 2008; Zannoni *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, el precipitado observado en la reducción de oxianiones de selenio a Se^0 por microorganismos es de color naranja intenso o rojo, tiene una estructura amorfa y suele ser bastante estable, formando nanopartículas esféricas que se encuentran rodeadas por una cubierta orgánica que estabiliza las SeNPs

y que incluye a algunas proteínas del microorganismo productor (Dobias *et al.*, 2011; Gonzalez-Gil *et al.*, 2016; Lampis *et al.*, 2017; Tugarova y Kamnev, 2017). En este sentido, en *T. selenatis*, particularmente, se ha descrito la proteína SefA que se encarga de la estabilización y transporte de las SeNPs, previniendo su agregación (Debieux *et al.*, 2011), aunque no se han descrito ortólogos a SefA en otros organismos. En resumen, al igual que existe un gran desconocimiento sobre las enzimas responsables directas de la reducción de Se^{4+} a Se^0 , tampoco se conocen los principios que rigen la génesis y secreción de las SeNPs al medio.

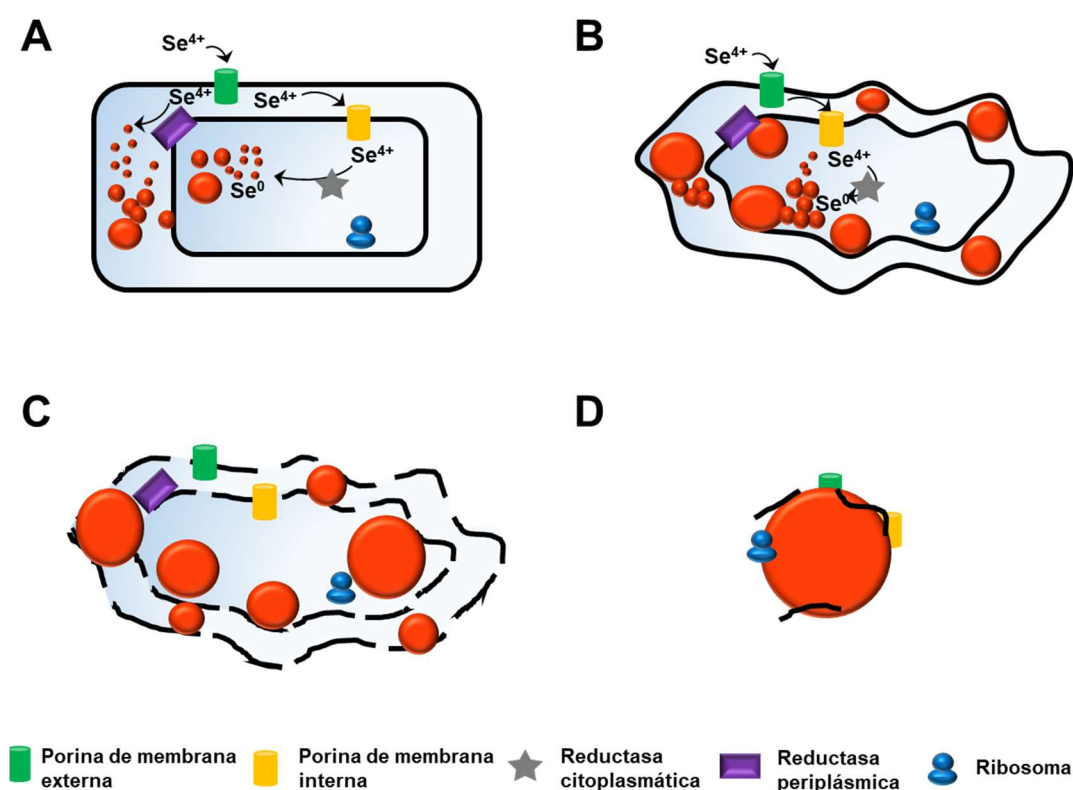


Figura 8. Modelo del mecanismo de producción intracelular y secreción de SeNPs en bacterias. **A)** El Se^{4+} entra al periplasma y al citoplasma a través de porinas. En ambos compartimentos puede ser reducido a Se^0 por sistemas inespecíficos de oxidorreducción, por ejemplo, sistemas de oxidorreductasas, formándose precipitados insolubles de Se^0 . **B)** La entrada de más Se^{4+} y la coalescencia de las SeNPs comprometen la viabilidad celular. **C)** El volumen ocupado por las SeNPs daña las membranas y termina lisando la célula. **D)** Las SeNPs son liberadas presentando una envuelta formada por restos de membrana y proteínas celulares adheridas. Adaptado de Gonzalez-Gil *et al.*, (2016).

En la figura 8, se presenta una de las hipótesis más aceptadas sobre la biogénesis de SeNPs en bacterias (Gonzalez-Gil *et al.*, 2016; Wadhwani *et al.*, 2016). De acuerdo a este modelo, tras la entrada del Se^{4+} en la célula, la reducción

a Se^0 puede darse por alguno de los mecanismos descritos anteriormente tanto en el periplasma como en el citoplasma (Fig. 8A), formándose precipitados de Se^0 que van coalesciendo hasta formar SeNPs de mayor tamaño (Fig. 8B) que pueden ocupar un gran volumen del compartimento celular comprometiendo así la viabilidad de la célula huésped (Fig. 8C). En la mayoría de los casos las SeNPs se encuentran asociadas a proteínas y materia intracelular y se liberan al medio tras la lisis bacteriana (Fig. 8D). Sin embargo, existen otras hipótesis respecto a la síntesis y liberación de las SeNPs (Nancharaiah y Lens, 2015) como, por ejemplo, la que implica a la proteína SefA en *T. selenatis*, comentada anteriormente (Debieux *et al.*, 2011), o la posible existencia de un sistema de secreción mediante vesículas propuesto en *Rhodospirillum rubrum* y que hasta la fecha no ha podido ser confirmado experimentalmente (Kessi *et al.*, 1999).

6.2.- Resistencia a teluro

El teluro es un metaloide que fue descubierto en 1781 por Franz-Josep Müller von Reichenstein. Pertenece, al igual que el selenio, al grupo de los calcógenos aunque, a diferencia de éste, el teluro no se ha demostrado que sea un elemento biológico esencial. Su abundancia en forma elemental es muy baja, encontrándose en la naturaleza principalmente en forma oxianiónica unido a otros elementos como el oro (Zannoni *et al.*, 2007). En los últimos años el interés por este elemento ha crecido exponencialmente debido a sus usos industriales que incluyen la producción de acero, paneles solares y baterías recargables. Las nanopartículas de teluro son de gran utilidad, debido a sus propiedades semiconductoras, en electrónica y en biomedicina (Zannoni *et al.*, 2007; Ba *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2012)..

Las formas predominantes del teluro en la naturaleza implican cuatro estados de oxidación diferentes: telurato (Te^{6+}), telurito (Te^{4+}), teluro elemental (Te^0), siendo éste muy escaso, y telururo (Te^{2-}). También puede formar parte de compuestos metilados como el dimetil telururo (DMTe) (Zannoni *et al.*, 2007) que, al igual que los compuestos metilados del selenio, es detectado por su fuerte olor a ajo. La síntesis de estos derivados metilados se debe a la actividad de enzimas tales como la S-tiopurina-metil-transferasa (TpmT) bacteriana que, al igual que

ocurre con el Se^0 , transforma el Te^0 en el compuesto volátil dimetil telururo (Ranjard *et al.*, 2002; 2003).

Se han aislado algunos microorganismos con la capacidad de crecer en presencia de telurato, incluso se ha documentado el uso de telurato como aceptor final de electrones en el metabolismo anaeróbico de algunas bacterias, sin que por el momento se hayan dilucidado los mecanismos moleculares específicos responsables de dicha respiración (Baesman *et al.*, 2009). Por lo que se refiere al telurito, se han aislado un buen número de bacterias resistentes capaces de reducirlo a su forma elemental e insoluble Te^0 , menos tóxica que las formas iónicas y caracterizada por formar un precipitado negro. Aunque no se conocen los mecanismos moleculares implicados en la reducción del telurito, se han propuesto los mismos mecanismos de reducción que los empleados para reducir selenito. Por ejemplo, se ha demostrado que la reducción de Te^{4+} a Te^0 puede estar mediada por grupos tiólicos (Turner *et al.*, 2012) o por algunas oxidorreductasas como la nitrato reductasa, al menos en ensayos *in vitro* (Sabaty *et al.*, 2001). Algunas bacterias son capaces de acoplar la reducción de Te^{4+} a Te^0 a la producción de nanopartículas de telurio elemental (TeNPs), las cuales pueden acumularse tanto intracelularmente, en el citoplasma o el periplasma (Baesman *et al.*, 2009; Ramos-Ruiz *et al.*, 2016), como extracelularmente (Turner *et al.*, 2012; Zare *et al.*, 2012; Borghese *et al.*, 2016; Ramos-Ruiz *et al.*, 2016).

El telurio es más tóxico que el selenio y, al igual que éste, su toxicidad viene dada en gran medida por su analogía con el azufre con la salvedad de que, además, puede desplazar al selenio en las selenoproteínas formándose aminoácidos como telurometionina o telurocisteína (Ba *et al.*, 2010). La alta toxicidad del telurio permitió que su primer uso, que data de principios del siglo XX, fuese como antimicrobiano, tras mostrar una gran capacidad de inhibir el crecimiento de muchos microorganismos patógenos (Fleming, 1932; Ba *et al.*, 2010). De hecho, la mayoría de bacterias son sensibles a concentraciones de telurito tan bajas como 1 $\mu\text{g/ml}$, lo cual supone una resistencia unas 100 veces inferior a la de otros elementos tóxicos como el cobre, el cromo, el hierro o el cadmio (Taylor, 1999; Chasteen *et al.*, 2009). El telurito también se ha usado como aditivo en medios de selección para el aislamiento de algunos patógenos resistentes

como por ejemplo *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* (Shimada *et al.*, 1990), *Shigella* spp. (Rahaman *et al.*, 1986), *Klebsiella pneumoniae* (Chiang *et al.*, 2008) o *E. coli* O157:H7 (Taylor *et al.*, 2002). Aunque su mecanismo de acción sigue siendo en gran medida desconocida, en algunos de estos organismos se han descrito algunos *clusters* génicos asociados a la resistencia a telurito (Chasteen *et al.*, 2009), como el operón *kilA* (*klaA**klaB**telB*) del plásmido RK2 (Walter *et al.*, 1991), el gen *arsB* de resistencia a arseniato (Turner *et al.*, 1992), el operón *tehAB* (*tehA**tehB*) que fue identificado por primera vez en la estirpe K12 de *E. coli* (Taylor *et al.*, 1994) o el *cluster terABCDEF* de *E. coli* O157:H7 (Taylor *et al.*, 2002), siendo este último el más estudiado. A pesar de que la función del *cluster terABCDEF* no ha podido ser del todo dilucidada, se ha demostrado que sólo son esenciales para conferir la resistencia a telurito la presencia de *terB*, *terC*, *terD* y *terE* (Taylor *et al.*, 2002). Los estudios realizados sobre las proteínas codificadas por estos genes han permitido conocer: (i) la estructura de la proteína TerB, mediante resonancia magnética nuclear, que conforma varias α -hélices con un dominio con cargas positivas en el extremo N-terminal y otro dominio con cargas negativas en el extremo C-terminal, que le hace presentar una estructura única no reportada previamente en ninguna otra proteína (Chiang *et al.*, 2008; Alekhina *et al.*, 2011), además se ha podido determinar que TerB se localiza preferentemente anclada a la membrana interna en contacto con el citosol. (Alekhina *et al.*, 2011); (ii) la localización transmembrana de TerC que forma, posiblemente, un complejo junto a TerB (Turkovicova *et al.*, 2016); y (iii) la gran homología existente entre TerD y TerE que hace presuponer una función común a ambas proteínas, en este sentido los estudios estructurales realizados sobre TerD han propuesto una conformación en sándwich-beta con dos dominios de unión a calcio, habiéndose sugerido su implicación en el mantenimiento de la homeostasis de calcio y en adaptación a estrés (Daigle *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ha podido determinar la universalidad de ninguno de estos genes de resistencia, ya que se han descrito multitud de cepas resistentes con diferentes sistemas de resistencia e incluso sin genes específicos de resistencia a telurito y capaces de producir el característico precipitado negro (Chasteen *et al.*, 2009).

En consecuencia, apenas se tiene conocimiento sobre los mecanismos exactos de resistencia a Te^{4+} , basados en la reducción, ni sobre los implicados en

su toxicidad (Turner *et al.*, 2012). Sobre esto último, se ha postulado que su toxicidad puede deberse, principalmente, a la gran cantidad de ROS que se genera durante la reducción de Te^{4+} a Te^0 , lo cual ha sido demostrado por el aumento de transcritos de genes inducibles por ROS y por el aumento de la actividad enzimática de enzimas de resistencia a ROS como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Chasteen y Bentley, 2003; Pérez *et al.*, 2007; Ba *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2012).

7.- Metabolismo bacteriano del arsénico

El arsénico es un metaloide poco abundante en la corteza terrestre, representando tan solo el 0,0001% (Oremland y Stolz, 2003). El arsénico es conocido principalmente por sus propiedades tóxicas aunque también posea propiedades farmacológicas (Cullen y Reimer, 1989). Aunque en un principio se pensó que el arsénico no era esencial para la vida, se ha podido demostrar que, en algunos organismos, el As es un elemento traza esencial para algunas reacciones metabólicas (Uthus, 2003). Los efectos tóxicos del arsénico han sido estudiados durante muchos años. Así, el arsénico fue el primer elemento químico al que se asoció un alto potencial cancerígeno, además de haber sido asociado al desarrollo de otras enfermedades como diabetes y desórdenes neurológicos y cardiovasculares, lo que ha llevado a incluirlo en los primeros puestos de las listas de sustancias químicas que suponen una gran amenaza para la salud (Rosen, 1971; Andres y Bertin, 2016). A pesar de ser un elemento poco abundante, su presencia natural en aguas subterráneas a partir de filtraciones de sedimentos ricos en minerales de arsénico y por el desarrollo de actividades antropogénicas han resultado en un aumento de la contaminación ambiental por arsénico (Belluck *et al.*, 2003). Especial atención merece el sur y sureste asiático, donde en los últimos años ha aumentado la preocupación y sensibilización por la gran amenaza para la salud de millones de personas que supone el consumo directo de aguas contaminadas con arsénico y de cultivos, especialmente de arroz, irrigados con estas aguas (Ng *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2006; Fendorf *et al.*, 2010).

La toxicidad de los compuestos arsenicales varía entre las diferentes especies, dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentren, que a su vez vienen determinadas por las condiciones físico-químicas del medio. El arsénico puede encontrarse formando parte tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos en cuatro estados de oxidación: arseniato (As^{5+}), arsenito (As^{3+}), arsénico elemental (As^0) y arseniuro (As^{-3}), siendo las formas arseniato y arsenito las predominantes en ambientes acuáticos y sedimentos (Stolz *et al.*, 2010; Yamamura y Amachi, 2014). La toxicidad del arseniato viene dada, principalmente, porque su estructura es análoga a la del fosfato y, por ello, utiliza los sistemas de transporte de fosfato (transportadores Pit y Pst) para entrar en la célula (Fig. 9). Una vez en el interior celular puede inhibir la fosforilación del ADP o formar parte de biomoléculas en sustitución de grupos fosfato, afectando al funcionamiento de las principales rutas metabólicas (Amend *et al.*, 2014). El arsenito es más soluble, más biodisponible y, por ello, 100 veces más tóxico que el arseniato. El arsenito entra en las células a través de acuaporinas que transportan pequeños solutos como la urea, el glicerol o el amonio (Fig. 9) (Meng *et al.*, 2004). El mecanismo de toxicidad del arsenito se ha asociado a su unión a grupos $-\text{SH}$ y residuos de cisteína, afectando a la funcionalidad o causando la inactivación de proteínas (Stolz *et al.*, 2010).

Atendiendo a la relación que establecen con el arsénico, los microorganismos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos (Oremland y Stolz, 2003; Stolz *et al.*, 2006): (i) DARPs (Dissimilatory Arsenate-Reducing Prokaryotes), bacterias reductoras de arseniato, capaces de utilizar el arseniato como aceptor final de electrones; (ii) ARMs (Arsenate-Resistant Microorganisms), bacterias capaces de reducir arseniato a arsenito como mecanismo de detoxificación; (iii) CAOs (Chemoautotrophic Arsenite Oxidizers), bacterias quimioautótrofas, aeróbicas o anaeróbicas, capaces de oxidar arsenito a arseniato obteniendo energía para el crecimiento y (iv) HAOs (Heterotrophic Arsenite Oxidizers) bacterias heterótrofas, aeróbicas estrictas capaces de oxidar arsenito a arseniato. Sin embargo, el aislamiento de nuevas cepas que no se encuadran en esta clasificación, ha aumentado el número de subgrupos. Así, Amend y colaboradores (2014) separan de las CAOs un nuevo subgrupo de bacterias denominadas PAOs (Phototrophic Arsenite Oxidizers) que incluye a aquellas

capaces de realizar una fotosíntesis anoxigénica utilizando arsenito como fuente de energía y añaden los DAOs (*Detoxifying Arsenite Oxidizers*) para incluir a bacterias capaces de oxidar arsenito a arseniato tan sólo como mecanismo de resistencia y no para la obtención de energía. En este último grupo incluyen a especies quimiolitótrofas y heterótrofas, las denominadas HAOs en la clasificación anterior.

Debido a la falta de consenso en la clasificación de las bacterias según su sistema de resistencia a arsénico y a la gran heterogeneidad presente en cada subgrupo, en esta Tesis Doctoral se tratará el metabolismo bacteriano del arsénico de acuerdo a los mecanismos genéticos involucrados en el mismo, que se desarrollarán con más detalle en los siguientes apartados. Dichos mecanismos se representan esquemáticamente en la figura 9: y consisten en: (i) detoxificación de arseniato via *ars*; (ii) respiración de arseniato via *arr*; (iii) oxidación aeróbica de arsenito via *aio*; y (iv) oxidación anaeróbica de arsenito via *arx*.

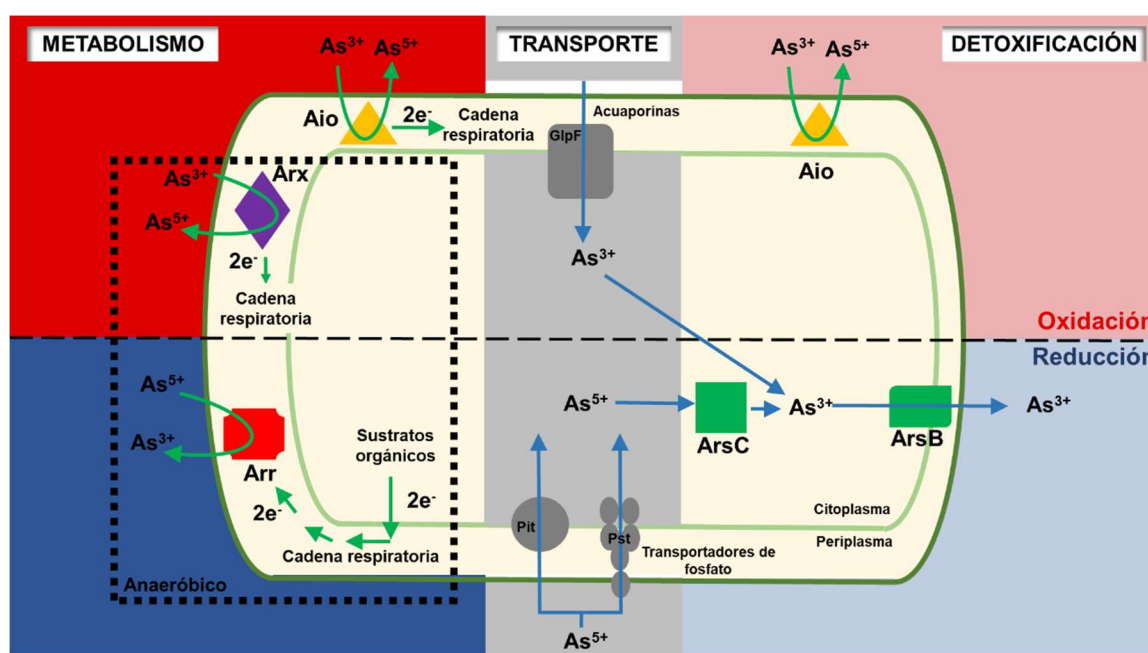


Figura 9. Metabolismo bacteriano del arsénico. Esquema de las diferentes estrategias de utilización y detoxificación de especies de arsénico descritas en bacterias. Se representan esquemáticamente: los sistemas de transporte de As^{3+} y As^{5+} (centro); los mecanismos de utilización de especies inorgánicas de arsénico en el metabolismo (izquierda), incluyendo el uso de As^{3+} como fuente de energía (enzimas Aio, aeróbicas, y Arx, anaeróbicas) y el uso de As(V) como aceptor final de electrones (enzima Arr, anaeróbica); mecanismos de detoxificación (derecha) incluyendo las enzimas Ars implicadas en la reducción de As^{5+} a As^{3+} y la oxidación de As^{3+} por Aio. Adaptado de Páez-Espino *et al.*, (2009) y Amend *et al.*, (2014).

7.1.- Detoxificación de arseniato: genes *ars*

Como se ha indicado anteriormente, los genes *ars* están relacionados con la resistencia a arsénico, sin implicar su utilización para el metabolismo energético de la célula. Los genes *ars* se organizan en operones, inducibles generalmente tanto por arsenito como por arseniato (Ji y Silver, 1992; Saltikov, 2011; Fernández *et al.*, 2014), y se han relacionado con una estrategia de resistencia a oxianiones de arsénico basada en una reducción citoplasmática, mediada por una arseniato reductasa, que transforma el As^{5+} a As^{3+} que posteriormente es bombeado fuera de la célula (Fig.9) (Amend *et al.*, 2014). Este operón de detoxificación ha sido ampliamente estudiado desde que fue descrito por primera vez en el plásmido R773 de *E. coli* (Hedges y Baumberg, 1973). Desde ese momento los genes *ars* han sido identificados tanto en plásmidos como en el cromosoma de un elevado número de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. También se han encontrado sistemas similares de resistencia en arqueas, levaduras y protistas (Jackson y Dugas, 2003; Páez-Espino *et al.*, 2009).

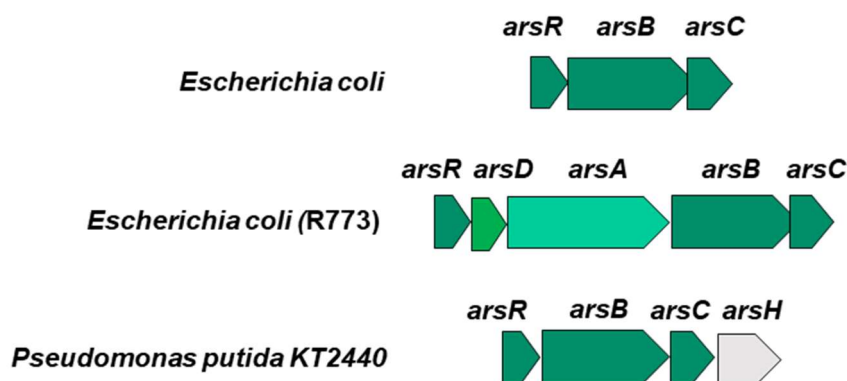


Figura 10. Esquemas de los principales tipos de organización de los genes *ars* de resistencia a arseniato. Se representan algunas de las configuraciones más extendidas y estudiadas del operón *ars*: los genes presentes en el cromosoma de *E. coli* (*arsRBC*); los genes presentes en el plásmido R773 de *E. coli* (*arsRDABC*); los genes presentes en el cromosoma de *P. putida* KT2440 (*arsRBCH*), esta bacteria presenta una duplicación de este cluster.

La organización del operón *ars* varía ampliamente entre bacterias (Fig. 10), siendo común en cepas altamente resistentes la presencia de varias copias de todo el operón o de algunos de sus componentes (Páez-Espino *et al.*, 2009; Andres y Bertin, 2016). La dotación mínima descrita es la configuración *arsRBC*,

presente en el cromosoma de algunas cepas de *E. coli* (Carlin *et al.*, 1995; Diorio *et al.*, 1995), de *P. fluorescens* (Prithivirajsingh *et al.*, 2001) y en plásmidos de *Staphylococcus aureus* (Ji y Silver, 1992). La versión extendida del operón suele contener los genes *arsRDABC* como, por ejemplo, en algunos plásmidos de *E. coli*, o los genes *arsRBCH* como, por ejemplo en, *P. putida* y *P. aeruginosa* (Páez-Espino *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014). Gracias a los estudios realizados durante décadas sobre estos operones *ars*, actualmente se dispone de una completa caracterización de las funciones de sus genes, resumiéndose los principales a continuación:

- *arsR* codifica la proteína reguladora del operón. En los modelos descritos, se trata de un represor transcripcional que es activo en forma de dímero (Shi *et al.*, 1994). El arsenito actúa como inductor, disociando el dímero y activándose así la transcripción de los genes del operón (Wu y Rosen, 1993).

- *arsB* codifica una proteína integral de membrana que conforma el canal iónico de la bomba de extrusión de As^{3+} (Wu *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1997). La energía para la extrusión del As^{3+} por ArsB puede obtenerse de la fuerza protón motriz, en los *clusters* con dotación mínima anteriormente descritos, o por la hidrólisis de ATP mediada por la proteína ArsA (Yang *et al.*, 2012).

- *arsA* codifica la subunidad catalítica de la bomba de extrusión. ArsA es una ATPasa encargada de la producción de energía que se requiere para el transporte del arsenito a través de ArsB (Zhou *et al.*, 2000).

- *arsD* codifica una metalochaperona que une en el citoplasma iones de As^{3+} aumentando así la afinidad de ArsA por el arsenito (Yang *et al.*, 2010).

- *arsC* codifica una arseniato reductasa citoplasmática que cataliza la reducción de As^{5+} a As^{3+} (Martin *et al.*, 2001). Se han descrito dos familias de arseniato reductasas que se diferencian en su estructura, mecanismo de reducción y localización del residuo catalítico de cisteína (Páez-Espino *et al.*, 2009). Por un lado, se encuentran las arseniato reductasas dependientes de tiorredoxinas, como por ejemplo la enzima ArsC de *B. subtilis* o de *S. aureus*. Por otro lado, se encuentran las reductasas dependientes de glutarredoxinas, como por ejemplo la enzima ArsC del plásmido R773 de *E. coli* (Messens y Silver, 2006).

Como se ha indicado anteriormente, en algunos operones *ars* se han identificado genes accesorios, como por ejemplo *arsH*, inicialmente de función desconocida (Oremland y Stolz, 2005; Páez-Espino *et al.*, 2009). Estudios recientes han permitido caracterizar un nuevo ciclo de utilización de especies de arsénico relacionado con la metilación en el que están involucrados los genes *arsM*, *arsI* y *arsH* (Yang y Rosen, 2016). El gen *arsM*, descrito por primera vez en el operón *ars* de *Rhodopseudomonas palustris*, codifica una S-adenosilmetionina metiltransferasa similar a las presentes en células humanas, que lleva a cabo la metilación de As^{3+} , formándose metil-arsenito y algunos derivados de éste (dimetil-arsenito y trimetil-arsina). Estos compuestos son volátiles, altamente tóxicos y responsables en gran parte del efecto cancerígeno que presentan los derivados del arsenito (Qin *et al.*, 2006; Yang y Rosen, 2016). La metilación del As^{3+} por ArsM conduce a la acumulación en el ambiente de compuestos metilados altamente tóxicos, por lo que resulta deseable la presencia de mecanismos de detoxificación de estos intermediarios. Uno de esos mecanismos implica al gen *arsI*, que codifica una liasa, ArsI, que ha sido caracterizada y cristalizada en *Thermomonospora curvata* (Nadar *et al.*, 2014). ArsI hidroliza el enlace C-As convirtiendo de nuevo el metil-arsenito en arsenito (Yang y Rosen, 2016). El segundo mecanismo de detoxificación de metil-arsenito involucra al gen *arsH*, más común en los genomas bacterianos secuenciados que los anteriores. Se conoce la presencia de este gen en algunos operones *ars* desde 1997, cuando fue descrito por primera vez en el operón *ars* de *Yersinia enterocolitica* (Neyt *et al.*, 1997), desde entonces se han depositado más de 9000 secuencias proteicas relacionadas con ArsH en los bancos de datos, si bien su papel fisiológico era desconocido hasta hace unos pocos años (Yang y Rosen, 2016). Recientemente se han caracterizado las enzimas ArsH en *Sinorhizobium meliloti* y en *P. putida* (Chen *et al.*, 2015), habiéndose descrito su funcionalidad como oxidasas de metil-arsenito y otros derivados trivalentes organoarsenicales a metil-arseniato, menos tóxico (Yang y Rosen, 2016), no presentando actividad ni sobre sustratos inorgánicos del arsénico ni sobre compuestos metilados pentavalentes (Chen *et al.*, 2015).

Pese a que los genes *ars* fueron descritos por primera vez hace más de 40 años, su estudio continúa revelando nuevos mecanismos de resistencia sobre

todo en lo que respecta al metabolismo de especies de arsénico orgánicas y de muestras provenientes de estudios metagenómicos que no habían podido ser caracterizadas anteriormente (Andres y Bertin, 2016). Prueba de ello es el reciente descubrimiento del ciclo de metilación/desmetilación anteriormente descrito o de otros genes accesorios de los *clusters ars* tales como *arsN* o *arsJ*. Mientras que el gen *arsN* codifica una posible acetil-transferasa (Andres y Bertin, 2016), el gen *arsJ* codifica la primera bomba de eflujo caracterizada con capacidad para exportar arsénico pentavalente, aunque las observaciones realizadas hasta el momento indican que es incapaz de exportar directamente As^{5+} sino una forma orgánica de este, el 1-arseno-3-fosfoglicerato (Chen *et al.*, 2016).

7.2.- Respiración de arseniato: genes *arr*

Además de la detoxificación de arseniato mediada por su reducción a arsenito con la enzima ArsC, algunas bacterias son capaces de utilizar anaeróbicamente este compuesto como aceptor final de electrones (Amend *et al.*, 2014). Desde el descubrimiento de la primera bacteria capaz de respirar arseniato, la cepa MIT-13 (Ahmann *et al.*, 1994), más tarde renombrada como *Geospirillum arsenophilus* (Lovley y Coates, 1997), se han descrito bacterias con genes *arr* en filos tan diversos como *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Oremland y Stolz, 2005), por lo que se ha sugerido que pueden encontrarse bacterias capaces de respirar arseniato distribuidas por todo el dominio Bacteria (Páez-Espino *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que la respiración de As^{5+} se lleva a cabo mediante un complejo enzimático de membrana (Macy *et al.*, 2000), denominado arseniato reductasa, que es un heterodímero codificado por los genes *arrAB* (Saltikov y Newman, 2003). ArrA (subunidad grande, 854 aminoácidos en *Shewanella* sp. ANA-3) es una molibdoпротеína perteneciente a la familia de las DMSO reductasas que contiene un *cluster* [4Fe-4S]; ArrB (subunidad pequeña, 234 aminoácidos en *Shewanella* sp. ANA-3) contiene de tres a cuatro *clusters* [4Fe-4S] (Silver y Phung, 2005). Hasta el momento, se han caracterizado bioquímicamente las arseniato reductasas de algunas bacterias como *Chrysiogenes arsenatis* (Krafft y Macy, 1998), *Bacillus selenitireducens* (Afkar *et al.*, 2003) y *Shewanella* sp. ANA-3 (Malasarn *et al.*, 2008), habiéndose demostrado en todas ellas la copurificación de la subunidades ArrA y ArrB, su asociación a membrana y su orientación hacia el

Introducción

periplasma (Van Lis *et al.*, 2013) Silver y Phung, 2005). Además, en algunas bacterias como *Desulfitobacterium hafniense*, *Alkaliphilus metalliredigens* o *Wolinella succinogenes* se ha identificado un tercer gen perteneciente al *cluster arr*, denominado *arrC* (Fig. 11) , que codifica una subunidad integral de membrana que puede servir de anclaje al complejo ArrAB y ayudar a la transferencia de electrones desde las quinonas a la arseniato reductasa (Páez-Espino *et al.*, 2009; Van Lis *et al.*, 2013).

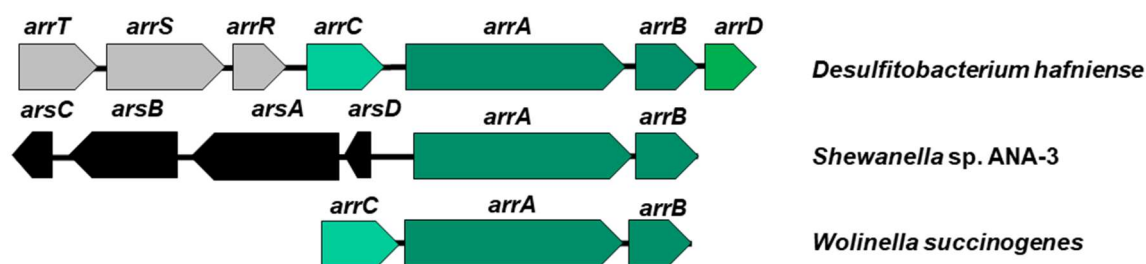


Figura 11. Operones *arr* de respiración de arseniato en bacterias. Se representan algunas de las organizaciones *arr* descritas hasta la fecha en *D. hafniense* (*arsTSRCABD*), *Shewanella* sp. ANA-3 (*arrAB*) donde se encuentran adyacentes a los genes *ars*, y *Wolinella succinogenes* (*arrCAB*).

Hasta la fecha no se tiene mucha información sobre la regulación y arquitectura de los operones *arr* en bacterias. (Fig. 11). En *Shewanella* sp. ANA-3 la expresión de los genes *arr* está controlada por la presencia de arseniato en el medio y bajo el control del regulador global FNR en condiciones anaeróbicas (Saltikov y Newman, 2003; Saltikov, 2011). En *D. hafniense*, además de los genes *arrAB* y *arrC* (proteína transmembrana), se ha identificado el gen *arrD* (posible chaperona) y tres genes de un posible sistema regulador de tres componentes, *i.e.*, *arrR* (regulador de respuesta), *arrS* (histidina quinasa sensora), y *arrT* (proteína periplásmica de unión a arseniato) (Saltikov, 2011; Van Lis *et al.*, 2013; Yamamura y Amachi, 2014). (Saltikov, 2011; Van Lis *et al.*, 2013; Yamamura y Amachi, 2014).

7.3.- Oxidación aeróbica de arsenito: genes *aio*

La oxidación bacteriana de As^{3+} fue descrita por primera vez en 1918 (Green, 1918), aunque no tuvo una gran repercusión en la investigación biológica hasta 1949 cuando se aislaron 15 cepas heterótrofas con capacidad para oxidar As^{3+} (Turner, 1949). Actualmente, se ha caracterizado un elevado número de bacterias oxidadoras de As^{3+} tanto heterótrofas como quimiolitotótrofas (Oremland y Stolz, 2003; Yamamura y Amachi, 2014). La oxidación heterotrófica de As^{3+} es generalmente considerada un mecanismo de detoxificación al convertir As^{3+} en la especie menos tóxica As^{5+} , aunque se ha observado que en algunas ocasiones puede utilizarse como una fuente suplementaria de energía durante la oxidación de compuestos orgánicos (Stolz *et al.*, 2010). Por su parte, los organismos quimiolitotótrofos usan As^{3+} como donador de electrones durante la fijación aeróbica de CO_2 (Amend *et al.*, 2014).

La arsenito oxidasa AioAB aeróbica se encuentra codificada por los genes *aio* (Lett *et al.*, 2012) y fue purificada por primera vez en 1992 en *Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992). La enzima es un heterodímero formado por una subunidad grande AioA (826 aminoácidos en *A. faecalis*) y una subunidad pequeña AioB (175 aminoácidos, en *A. faecalis*), asociadas a membrana y orientadas al periplasma. AioA es una molibdo proteína perteneciente a la familia de las DMSO reductasas con un núcleo [3Fe-4S] (Ellis *et al.*, 2001), relacionada filogenéticamente con ArrA (Oremland y Stolz, 2003; Silver y Phung, 2005), mientras que AioB presenta un *cluster* Rieske [2Fe-2S] implicado en la transferencia de electrones (Ellis *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2017).

La organización genética del *cluster aio* en diferentes bacterias muestra que los únicos genes estrictamente conservados son *aioA* y *aioB*, que presentan la misma orientación (Van Lis *et al.*, 2013). En algunos genomas de *Proteobacteria* se han caracterizado genes accesorios, *i.e.*, *aioR*, *aioS*, *aioX*, *aioC* y *aioD* que codifican: un sistema de dos componentes formado por un regulador de respuesta y una histidina quinasa, una proteína de unión a arsenito, un citocromo *c* y una proteína relacionada con la síntesis de cofactores de molibdeno, respectivamente (Andres y Bertin, 2016). La regulación de la expresión de los genes *aio* es

dependiente de la fase de crecimiento y, en algunas bacterias, se ha ligado a sucesos de *quorum sensing* (Kashyap *et al.*, 2006).

7.4.- Oxidación anaeróbica de arsenito: genes *arx*

El *cluster arx* codifica las enzimas responsables de oxidar arsenito anaeróbicamente, tratándose del último mecanismo de arsenotrofia descrito en bacterias. Su regulación y fisiología aún se encuentran muy poco estudiados dado que dicho *cluster* ha sido descrito en un número escaso de bacterias. Los genes *arx* se ha identificado mayoritariamente en especies extremófilas, adaptadas a ambientes con altas concentraciones de arsénico, que son difíciles de cultivar y manipular en el laboratorio (Hernandez-Maldonado *et al.*, 2017). Sólo se ha podido demostrar experimentalmente la utilización de arsenito como única fuente de energía, mediada por los genes *arx*, en las bacterias *Alkalilimnicola ehrlichii* cepa MLHE-1 (Zargar *et al.*, 2010, 2012), la cual liga la oxidación de arsenito a la respiración de nitrato, y en *Ectothiorhodospira* sp. BSL9 (Hernandez-Maldonado *et al.*, 2017), cepa fotoautótrofa que acopla, anaeróbicamente, la oxidación del arsenito a la fijación de CO₂ (Oremland *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante señalar que el *cluster arx*, al contrario que los anteriormente descritos, parece encontrarse altamente conservado en los seis organismos secuenciados en los que se ha identificado así como en los estudios metagenómicos realizados (Andres y Bertin, 2016; Oremland *et al.*, 2017)

Los genes *arx* se identificaron por primera vez en *A. ehrlichii* MLHE-1 tras observarse que era capaz de oxidar arsenito anaeróbicamente (Zargar *et al.*, 2010). El análisis de su genoma reveló que esta bacteria carecía de genes *aio* pero que, sin embargo, presentaba un par de genes homólogos a *arrAB*, denominándose *arxA* y *arxB*, que codificaban enzimas de una nueva familia de oxidorreductasas (Zargar *et al.*, 2010). La enzima responsable de la oxidación anaeróbica del arsenito es un heterodímero de unión a membrana y orientado hacia el periplasma que está formado por una subunidad grande (ArxA) y otra subunidad pequeña (ArxB), siendo ArxA una molibdo proteína perteneciente a la familia de las DMSO reductasas más cercana evolutivamente a la arseniato reductasas ArrA que a las arsenito oxidasas AioA (Fig. 12A), (Zargar *et al.*, 2012). En la figura 12B se puede observar la organización de los genes *arx* en las dos

primeras cepas en las que se describió, *A. ehrlichii* MLHE y *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1, formando dos operones divergentes, *i.e.*, *arxXSR*, que codifica posibles proteínas reguladoras, y *arxB2ABCD* (Zargar *et al.*, 2010, 2012; Andres y Bertin, 2016; Hernández-Maldonado *et al.*, 2017).

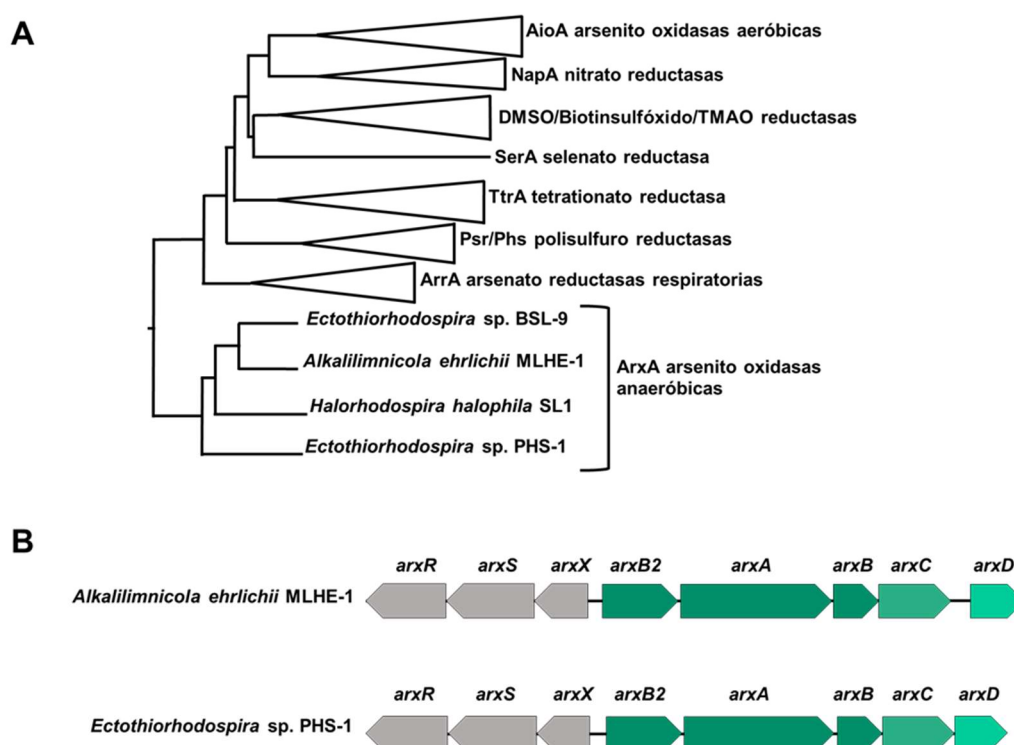


Figura 12. Distribución filogenética de la enzima ArxA y organización genética del cluster *arx*. **A)** Árbol filogenético que presenta la distribución en clados de diferentes enzimas de la familia DMSO reductasas en el que se muestra detallada la distribución de las enzimas ArxA más estudiadas. Adaptado de Hernández-Maldonado *et al.* (2017). **B)** Organización genética del cluster *arx*, en las dos cepas bacterianas mejor caracterizadas, mostrando dos operones divergentes.

Como se ha señalado anteriormente, la arsenito oxidasa anaeróbica es un heterodímero. ArxA (828 aminoácidos en *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1) es la subunidad mayor de la enzima y presenta un cofactor de molibdeno que contiene además un cluster [4Fe-4S]. Existen dos genes, *arxB* y *arxB2*, que codifican la subunidad pequeña ArxB (248 y 396 aa, respectivamente), la cual contiene posiblemente tres clusters [4Fe-4S]. El resto de genes del operón catabólico *arx* codifican las proteínas ArxC, proteína transmembrana relacionada con las interacciones redox con quinonas durante la transferencia de electrones, y ArxD, chaperona citoplasmática de tipo TorD que protege a las molibdopterinas de su

degradación hasta la incorporación del cofactor. El segundo operón del *cluster arx* contiene tres genes que codifican proteínas relacionadas con la regulación del *cluster*: ArxX, una proteína periplásmica de unión a arsenito; ArxR y ArxS, un sistema regulador de dos componentes formado por un regulador de respuesta y su histidina-quinasa asociada, respectivamente (Zargar *et al.*, 2010, 2012).

8.- Estudios sobre la resistencia a metales pesados y metaloides en bacterias del género *Azoarcus*

Cuando se inició la presente Tesis Doctoral no existían trabajos publicados relacionados con la resistencia de bacterias del género *Azoarcus* a metales y metaloides, a excepción de algunos estudios sobre la capacidad de algunas cepas autótrofas, no secuenciadas, para utilizar arsenito como fuente de energía. En 2006 se publicó una investigación en la que había aislado en un suelo contaminado con arsénico una nueva cepa del género, *Azoarcus* sp. DAO1, autótrofa y capaz de oxidar el As^{3+} en condiciones desnitrificantes para la fijación de carbono (Rhine *et al.*, 2006). Años más tarde, se caracterizaron las cepas *Azoarcus* sp. EC1-pb1 y *Azoarcus* sp. EC3-pb1 que habían sido previamente aisladas de suelos libres de arsénico (Sun *et al.*, 2009). Estas cepas, también autótrofas, fueron capaces de oxidar completamente As^{3+} tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Rodríguez-Freire *et al.*, 2012). Sin embargo, la ausencia de información genómica sobre estas cepas no ha permitido identificar los genes responsables del metabolismo del arsenito.

8.1.- Genes relacionados con resistencia a metales pesados y metaloides en *Azoarcus* sp. CIB

El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB reveló una gran cantidad de *clusters* génicos que podrían estar relacionados con la resistencia a un amplio repertorio de metales tales como cobre, cadmio o mercurio (Tabla 3) (Martín-Moldes *et al.*, 2015). La mayoría de estos genes se encuentran agrupados en una isla genómica (isla genómica VII, AzCIB_1658-AzCIB_1736) flanqueada por elementos móviles con un contenido en GC (63%) menor que el del resto del genoma (65,85%), lo que sugiere su adquisición mediante transferencia

horizontal. Además de la presencia de genes posiblemente implicados en la resistencia a metales pesados, se han podido identificar dos posibles *clusters* de resistencia a arsénico, guardando el primero de ellos una alta identidad con el cluster *ars* (AzCIB_1124-AzCIB_1128) y el segundo con el cluster *arx* (AzCIB_1144-AzCIB_1151).

Tabla 3. Posibles genes de resistencia a metales pesados codificados en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB.

Metal	Función	Gen
Mercurio		
	Regulador transcripcional	AzCIB_1669 (<i>merR1</i>)
	Proteína transportadora de Hg	AzCIB_1670 (<i>merT1</i>)
	Regulador transcripcional	AzCIB_1680 (<i>merR</i>)
	Regulador transcripcional	AzCIB_1681 (<i>merR2</i>)
	Proteína transportadora de Hg	AzCIB_1682 (<i>merT2</i>)
	Proteína periplásmica de unión a Hg	AzCIB_1683 (<i>merP</i>)
Cobre y/o Plata		
	ATPasa de tipo P	AzCIB_1154 (<i>copA1</i>)
	Proteína K de resistencia a Cu	AzCIB_1158
	Regulador transcripcional de la familia MerR	AzCIB_1164
	ATPasa de tipo P	AzCIB_1165 (<i>copA5</i>)
	Proteína periplásmica de unión a Cu, bomba RND	AzCIB_1175 (<i>cusF3</i>)
	Proteína CusA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1176 (<i>cusA3</i>)
	Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1177 (<i>cusB3</i>)
	Proteína de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1178
	Proteína de resistencia a Cu/Ag	AzCIB_1179 (<i>cusD3</i>)
	Proteína K de resistencia a Cu	AzCIB_1702
	Proteína K de resistencia a Cu	AzCIB_1703
	Proteína K de resistencia a Cu	AzCIB_1705
	ATPasa de tipo P	AzCIB_1712 (<i>copA2</i>)
	Proteína CusA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1724 (<i>cusA1</i>)
	Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1725 (<i>cusB1</i>)
	Proteína de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1726
	Proteína periplásmica de unión a Cu, bomba RND	AzCIB_1727 (<i>cusF1</i>)
	Proteína de tolerancia a Cu, bomba RND	AzCIB_1728 (<i>cusC1</i>)
	Proteína de membrana de externa de eflujo de iones	AzCIB_1729
	Regulador de respuesta CusR	AzCIB_1732 (<i>cusR1</i>)
	Hisdina quinasa sensora CusS	AzCIB_1733 (<i>cusS1</i>)

Introducción

Proteína transportadora de metales pesados	AzCIB_3087 (<i>copZ</i>)
ATPasa de tipo P	AzCIB_3088 (<i>copA2</i>)
Regulador transcripcional de la familia MerR	AzCIB_3089 (<i>copY</i>)
ATPasa de tipo P	AzCIB_3108 (<i>copA4</i>)
Histidina quinasa sensora CusS	AzCIB_3961 (<i>cusS1</i>)
Regulador de respuesta CusR	AzCIB_3162 (<i>cusR1</i>)
Proteína periplásmica de unión a Cu, bomba RND	AzCIB_3163 (<i>cusF1</i>)
Proteína de membrana externa, bomba RND	AzCIB_3164
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_3165 (<i>cusB2</i>)
Proteína CusA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_3166 (<i>cusA2</i>)

Zinc, Cadmio
y Níquel

Proteína hipotética conservada en los <i>clusters czc</i>	AzCIB_1623
Proteína CzcA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1624 (<i>czcA3</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1625 (<i>czcB3-1</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1626 (<i>czcB3-2</i>)
Proteína CzcC de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1627 (<i>czcC3</i>)
Histidina quinasa sensora CzcS	AzCIB_1685 (<i>czcS</i>)
Regulador de respuesta CzcR	AzCIB_1686 (<i>czcR</i>)
Proteína hipotética conservada en los <i>clusters czc</i>	AzCIB_1687
Proteína hipotética conservada en los <i>clusters czc</i>	AzCIB_1688 (<i>czcI</i>)
Proteína CzcC de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1689 (<i>czcC2</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1690 (<i>czcB2-1</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1691 (<i>czcB2-2</i>)
Proteína CzcA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1692 (<i>czcA2</i>)
Proteína hipotética conservada en los <i>clusters czc</i>	AzCIB_1693
Proteína hipotética conservada en los <i>clusters czc</i>	AzCIB_1719
Proteína CzcA de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1720 (<i>czcA1</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1721 (<i>czcB1-1</i>)
Proteína de membrana, bomba RND	AzCIB_1722 (<i>czcB1-2</i>)
Proteína CzcC de membrana externa, bomba RND	AzCIB_1723 (<i>czcC1</i>)

Adaptado de (Martín-Moldes *et al.*, 2015).

El descubrimiento de estos genes en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB abría una nueva línea de investigación que no se había abordado previamente en ninguna bacteria del género *Azoarcus* como es la resistencia a metales y metaloides. Es por ello que en esta Tesis Doctoral se planteó investigar la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para resistir diferentes metales, analizar la base molecular de dichas resistencias y diseñar posibles aplicaciones biotecnológicas en el campo de la revalorización de metales contaminantes.

IV. OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción, el género *Azoarcus* está compuesto por bacterias que presentan una gran diversidad metabólica y un gran potencial e interés medioambiental. Así, se ha estudiado en varias cepas su capacidad de vivir como endófitos de gramíneas y, en otras cepas, los mecanismos de degradación de compuestos aromáticos. Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral no se había podido demostrar la capacidad de ninguna cepa de *Azoarcus* perteneciente al grupo de los degradadores aneróbicos de compuestos aromáticos para adaptarse a un estilo de vida endófito ni se había estudiado la resistencia a metales pesados y metaloides.

El estudio del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, cepa en la que se ha estudiado ampliamente el metabolismo y la regulación de la degradación de compuestos aromáticos, permitió identificar agrupaciones génicas posiblemente involucradas en la interacción con la planta y la resistencia a metales pesados y metaloides. En base a estos precedentes, se decidió profundizar en el estudio de capacidad de adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a diferentes condiciones ambientales, definiendo los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Estudio de la interacción *Azoarcus*-planta y caracterización de sus propiedades PGP.
- **Objetivo 2:** Análisis de los determinantes genéticos bacterianos responsables de la asociación entre *Azoarcus* sp. CIB y la planta.
- **Objetivo 3:** Análisis de la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a metales pesados y metaloides y caracterización de la producción de nanopartículas.
- **Objetivo 4:** Estudio de los mecanismos de resistencia a arseniato y arsenito en *Azoarcus* sp. CIB.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos y semillas

La tabla 4 muestra las cepas bacterianas empleadas en este trabajo, junto con sus genotipos y características más relevantes. Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 5, donde se muestra el nombre de cada plásmido y sus características más relevantes.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i>		
CC118	$\Delta(ara-leu)$, $araD$, $\Delta lacX74$, $galE$, $galK$, $phoA20$, $rpoB$, $thi-1$, $rpsE$, (Sp^R), (Rf^R), $argE$, (Am), $recA1$	(Manoil y Beckwith, 1985)
DH10B	F' , $mcrA$, $\Delta(mrr\ hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, $deoR$, $recA1$, $araD139$, $\Delta(ara-leu)7697$, $galU$, $galK$, $rpsL$ (Sm^R), $endA1$, $nupG$	Life Technologies
S17-1 λ pir	Tp^R , Sm^R , $recA$, thi , $hsdRM^+$ RP4::2- $Tc::Mu::Km$, $Tn7$, λ pir lisogénico	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
<i>Burkholderia phytofirmans</i>		
PsJN	Cepa silvestre	(Sessitsch <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pseudomonas syringae</i>		
pv. <i>syringae</i>	Cepa silvestre	(Anzai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>trifolii</i> TT-7C	Cepa silvestre	(Ruiz-Díez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Azoarcus communis</i>		
SWub3	Cepa silvestre	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azoarcus</i> sp. CIB		
CIB	Cepa silvestre	(López-Barragán <i>et al.</i> , 2004)
CIBd <i>pilX</i>	Km^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>pilX</i>	Este trabajo
CIBd <i>fliM</i>	Km^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>fliM</i>	Este trabajo
CIBd <i>epsF</i>	Km^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>epsF</i>	Este trabajo
CIBd <i>arsC</i>	Km^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>arsC</i>	Este trabajo
CIBd <i>arsB</i>	Km^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>arsB</i>	Este trabajo

CIBdarsC2	Km ^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>arsC2</i>	Este trabajo
CIBdarxA	Km ^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>arxA</i>	Este trabajo

Tabla 5. Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pSEVA237	Km ^R , <i>ori</i> pBBR1, expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) constitutivamente con promotor <i>PlexA</i>	(Fernández-Llamas <i>et al.</i> , 2014)
pSEVA237 <i>acdS</i>	Km ^R , derivado de pSEVA237 que incluye un fragmento <i>AscI</i> de 1172 pb con el promotor <i>Ptac</i> y el gen <i>acdS</i> obtenidos del plásmido pIZ <i>acdS</i>	Este trabajo
pIZ1016	Gm ^R , derivado del vector de clonación y expresión de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 con el promotor <i>Ptac</i> y el gen <i>lacI</i> de pMM40	(Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003)
pIZ <i>acdS</i>	Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>acdS</i> de <i>B. phytofirmans</i> PsJN bajo el control del promotor <i>Ptac</i>	Este trabajo
pIZ2133	Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen PA2133 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bajo el control del promotor <i>Ptac</i>	(Martín-Moldes <i>et al.</i> , 2016)
pIZ4959	Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen PP4959 de <i>P. putida</i> KT2440 bajo el control del promotor <i>Ptac</i>	(Martín-Moldes <i>et al.</i> , 2016)
pK18 <i>mob</i>	Km ^R , <i>oriColE1</i> , <i>Mob</i> ⁺ , <i>lacZα</i> , vector suicida para la construcción de mutantes por inserción mediante recombinación homóloga	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobpilX</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 455 pb con una secuencia interna del gen <i>pilX</i>	Este trabajo
pK18 <i>mobfliM</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 512 pb con una secuencia interna del gen <i>fliM</i>	Este trabajo
pK18 <i>mobepsF</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 635 pb con una secuencia interna del gen <i>epsF</i>	Este trabajo
pK18 <i>mobarsC</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 468 pb con una secuencia interna del gen <i>arsC</i>	Este trabajo
pK18 <i>mobarsB</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 557 pb con una secuencia interna del gen <i>arsB</i>	Este trabajo
pK18 <i>mobarsC2</i>	Km ^R , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> de 551 pb con una secuencia interna del gen <i>arsC2</i>	Este trabajo

pK18mobarxA

Km^R, derivado de pK18mob que incluye un fragmento *Hind*III y *Bam*HI de 493 pb con una secuencia interna del gen *arxA*

Este trabajo

Las semillas de *Oriza sativa* L. variedad Gleva utilizadas en este trabajo fueron cedidas por la empresa Semillas Castells S.L. (Tarragona) y las plantas de *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* (Lewis y Nicholson, 2007) por el Dr. Francisco Tenllado (CIB-CSIC).

2.- Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo, en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. Para los crecimientos bacterianos se utilizaron diferentes medios de cultivo cuya composición aparece reseñada a continuación.

2.1.- Medio de cultivo utilizados para *Azoarcus* sp. CIB, *A. communis* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Para los cultivos en medio rico de *Azoarcus* sp. CIB y *A. communis* y para la realización de recuentos de viables extraídos de raíces de arroz, se utilizó una variación del medio VM-Etanol (pH 6,8) (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) con la siguiente composición (para 1 litro): KH₂PO₄ 0,4 g; K₂HPO₄ 0,6 g; NaCl 1,1 g, NH₄Cl 0,5g; MgSO₄·7H₂O 0,2 g; CaCl₂ 26 mg; MnSO₄ 10 mg; Na₂MoO₄ 2 mg; Fe(III)-EDTA 66 mg, extracto de levadura 1 g; bactopectona 3 g; etanol 6 ml.

El medio mínimo empleado para cultivar las cepas de *Azoarcus* sp. CIB y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* está basado en el medio basal MA (pH 7,5), cuya composición, para un litro, se detalla a continuación: KH₂PO₄ 0,33 g; Na₂HPO₄ 1,2 g; NH₄Cl 0,11 g; MgSO₄·7H₂O 0,1 g; CaCl₂ 0,04 g. Este medio basal fue suplementado con una solución de elementos traza (pH 6,5), cuya composición (1000x para 1 l de H₂O destilada) se detalla a continuación: ácido nitrilotriacético (NTA) 1,5 g; MgSO₄·7H₂O 3,0 g; MnSO₄·2H₂O 0,5 g; NaCl 1,0 g; FeSO₄·7H₂O 0,1 g; CoSO₄·7H₂O 0,18 g; NaSeO₃ 5H₂O 0,3 g; ZnSO₄·7H₂O 0,18g; CuSO₄·5H₂O

0,01 g; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g; H_3BO_3 0,01 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g. También se suplementó el medio MA con una solución de vitaminas cuya composición (1000x para 1 l de H_2O destilada) es la siguiente: biotina 20 mg; piridoxina-HCl 10 mg; riboflavina 50 mg; D-pantotenato cálcico 50 mg; ácido *p*-aminobenzoico 50 mg; ácido fólico 20 mg; tiamina-HCl $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mg; ácido nicotínico 50 mg y vitamina B_{12} 50 mg. Al medio MC (medio basal suplementado con vitaminas y elementos traza) se le añadieron las siguientes fuentes de carbono esterilizadas mediante filtración: glucosa para el crecimiento de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, piruvato y benzoato para el crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB y glutarato para la selección de transconjugantes en experimentos de conjugación con *Azoarcus* sp. CIB. Las fuentes de carbono se utilizaron, generalmente, a una concentración final del 0,2% (m/v), salvo que se indique lo contrario.

Para el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB se añadió al medio MC KNO_3 10 mM como aceptor final de electrones. La desnitrificación fue monitorizada midiendo los niveles de NO_3^- y NO_2^- con el *Test Nitrates* (Merck). Para asegurar el ambiente reductor, se añadió al medio MC una solución de sulfuro ferroso a una concentración final de 0,044 mg/ml.

Para los ensayos de fijación de nitrógeno se creció *Azoarcus* sp. CIB en una adaptación del medio libre de nitrógeno MNF (Elbeltagy *et al.*, 2001) con la siguiente composición: Solución A (para 900 ml de H_2O destilada): K_2HPO_4 0,8 g; KH_2PO_4 0,2 g; NaCl 0,1 g; Na_2FeEDTA 28 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 mg; extracto de levadura 100 mg. Solución B (para 100 ml de H_2O destilada): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g; CaCl_2 0,06 g. Las dos soluciones se autoclavaron por separado, añadiéndose después la fuente de carbono, elementos traza y vitaminas de igual composición y concentración que en el medio MC.

En el ensayo de solubilización de fosfato *Azoarcus* sp. CIB se creció en placas de medio MALP (medio MA modificado) con la siguiente composición por 1 l de H_2O destilada: KH_2PO_4 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; NH_4Cl 0,1 g y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g. Una vez autoclavado se añadieron las vitaminas, elementos trazas y piruvato como fuente de carbono a la misma concentración que en el medio MC.

Materiales y métodos

Para los ensayos de actividad ACC desaminasa se utilizó una adaptación del medio DF (Dworkin y Foster, 1958), cuya composición para 1 l de H₂O destilada es: KH₂PO₄ 4,0 g; Na₂HPO₄ 6,0 g; MgSO₄·7H₂O 0,2 g; glucosa 2,0 g; piruvato 2,0 g. Posteriormente se añadieron los elementos traza y vitaminas descritos para el medio MC.

Los ensayos de resistencia a metales y metaloides se realizaron en medio mínimo MC con piruvato al 0,2% (m/v) como fuente de carbono y añadiendo la concentración de metal/metaloide indicada en cada caso. Cuando fue necesario, los medios de cultivos fueron modificados añadiendo 40 mg/l de 2,4-dinitrofenol (DNP) al inicio del crecimiento. Debido a que el DNP fue preparado en etanol, se llevaron cultivos control suplementados con el mismo volumen de este solvente.

Cuando se indica, las condiciones de déficit de nutrientes se obtuvieron limitando: (i) el donador de electrones utilizando medios con la concentración estándar de nitrato (10 mM) y limitando la cantidad de piruvato al 0,1% (m/v); (ii) limitando el aceptor de electrones utilizando una concentración estándar de piruvato (0,2%) y rebajando la concentración de nitrato a 5 mM. Para evitar las condiciones limitantes de nutrientes se añadieron, antes de que el cultivo llegara a fase estacionaria, cantidades adicionales de fuente de carbono (0,2 % de piruvato) y de aceptor de electrones (10 mM).

Para los estudios de expresión génica de los genes *ars* se creció *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) y se añadió arseniato a una concentración final de 10 mM y arsenito a una concentración final de 1 mM, incubándose durante 48 h. Para los estudios de expresión génica de los genes *arx* se creció *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) y tras 24 h se añadió arseniato o arsenito a una concentración final de 10 mM y 1 mM, respectivamente, incubándose los cultivos durante 4 horas a 30°C (con agitación en el caso de los cultivos aeróbicos). Tras la incubación se recogieron las células por centrifugación para la extracción de RNA y estudios de RT-PCR cuantitativa según los protocolos descritos en los apartados 3.4 y 3.5, respectivamente.

En todos los medios de cultivo, cuando fueron requeridos, se añadieron antibióticos a la concentración que se detalla en el apartado 2.3.

2.2.- Medios de cultivo utilizados para *E. coli*, *P. syringae* pv. *syringae* y *B. phytofirmans*

El medio rico empleado para *E. coli*, *P. syringae* pv. *syringae* y *B. phytofirmans* fue *Lysogeny Broth* (LB) (Sambrook y Russell, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron en medio LB complementado con agar al 1.5% (m/v). En los ensayos en los que fue necesario, se creció a *B. phytofirmans* en medio mínimo DF (Penrose y Glick, 2003), cuya composición se detalla en el apartado 2.1. Cuando fueron requeridos, se añadieron antibióticos a la concentración que se detalla en el apartado 2.3.

2.3.- Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en agua. Las soluciones se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican: kanamicina (Km) 50 µg/ml y gentamicina (Gm) 10 µg/ml.

2.4.- Obtención de condiciones anaeróbicas

Para obtener condiciones de anaerobiosis, el medio de cultivo, así como las soluciones de elementos traza, nitrato potásico, sulfuro ferroso y todos los compuestos que fueron utilizados como fuente de carbono, se dispensaron en frascos de vidrio, los cuales se taparon con tapones de goma y se sellaron con arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se inyectó una aguja conectada a un depósito de nitrógeno (Air Liquide), permitiendo pasar un flujo de este gas al medio líquido durante varios minutos con el objeto de eliminar el oxígeno. Finalmente, todos los frascos fueron autoclavados. Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (las cuales son sensibles al calor) se realizó la misma operación, descrita anteriormente, pero con frascos de vidrio vacíos en los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó la solución de vitaminas mediante una jeringa conectada a un filtro estéril Millipore (de 0,2 µm de diámetro de poro). Una vez preparadas estas soluciones, fueron añadidas al medio basal MA para obtener así el medio MC complementado con las correspondientes fuentes de carbono. Tanto la filtración de las soluciones de

vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo, se realizaron en una cámara de anaerobiosis (Forma Scientific).

2.5.- Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas se crecieron aeróbicamente tanto en medios líquidos (con una agitación de 250 rpm) como sólidos. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C, mientras que *B. phytofirmans*, *P. syringae*, *R. leguminsarum*, *A. communis* y *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron a 30°C. Los cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB se realizaon a 30 °C sin agitación.

El crecimiento de los cultivos fue monitorizado midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600}) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-260 o mediante recuento de viables. La morfología celular se analizó con un microscopio de contraste de fase Nikon OPTIPHOT-2.

2.6.- Conservación de las cepas bacterianas

Durante períodos cortos de tiempo (inferiores a un mes), las estirpes bacterianas se conservaron a 4°C en placas de medio LB, VM o medio mínimo. Los cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB se conservaron adecuadamente durante un periodo aproximado de un mes a 4 °C en viales de vidrio. Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente suplementado con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

3.- Técnicas de manipulación de DNA y RNA

La manipulación del DNA, así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La DNA ligasa T4 fue suministrada por New England Biolabs. La DNA polimerasa I fue suministrada por Biotools y la polimerasa de alta fidelidad *Phusion*® por New England Biolabs.

Todas las enzimas se emplearon según las especificaciones de las diferentes casas comerciales.

3.1.- Extracción y purificación de DNA

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso de *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche). El DNA cromosómico se extrajo empleando el kit *Illustra™ bacteria genomic Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare). La concentración y pureza del DNA obtenido se analizó mediante un análisis espectrofotométrico analizando el ratio A_{260}/A_{280} (Nanophotometer Pearl, IMPLEN) y mediante la visualización en geles de agarosa.

3.2.- Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y la polimerasa *Phusion®*. Las mezclas de reacción contenían $MgCl_2$ 1,5 mM, oligonucleótidos 0,5 μM y dNTPs 0,25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). En la Tabla 6 se detalla la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, así como las dianas de restricción correspondientes en cada caso. Los oligonucleótidos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich.

Las condiciones estándar de PCR fueron las siguientes: un primer ciclo de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C (o a la temperatura adecuada de hibridación de los oligonucleótidos, optimizada por gradiente de temperaturas), 1 min por cada 1000 pb del fragmento a amplificar a 72 °C; un ciclo final de 5 min a 72 °C.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la realización de este trabajo. Las regiones subrayadas indican la diana de restricción que se detalla entre paréntesis al final de la secuencia

Nombre	Secuencia 5' → 3' (Diana de restricción)	Utilización
5'RBSacdS	CCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAATAATGA ACCTGCAACGATTCCCTCGTTAC (<i>HindIII</i>)	Clonación del gen <i>acdS</i> de <i>B. phytofirmans</i> PsJN en pIZ1016
3'acdS	GG <u>ACTAGT</u> TTTAGCCGTTGCGGAAAATGAAGC TG (<i>SpeI</i>)	Clonación del gen <i>acdS</i> de <i>B. phytofirmans</i> PsJN en pIZ1016
5'PtacacdS	TTGGCGCGCCCTGGCAAATATTCTGAAATGA GCTG (<i>AscI</i>)	Subclonación de <i>acdS</i> en pSEVA237

Materiales y métodos

5'PtacacdS	TTGGCGCGCCTTAGCCGTTGCGGAAAATGAA G (<i>Ascl</i>)	Subclonación de <i>acdS</i> en pSEVA237
5'pilX	CGGGATCCCTGCTGGCCGTCTCCGCGATC (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>dpilX</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'pilX	CCCAAGCTTGTGTCATTTCCACAGCGAAGTGG (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>dpilX</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-pilX	AGGGTGCAGTCCTTTTCGT	Chequeo de la construcción del mutante <i>dpilX</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-pilX	CTCAGGTAGTCCAAGGCGTC	Chequeo de la construcción del mutante <i>dpilX</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'fliM	CGGGATCCCCGACGAACCTGAACCTCATC (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>dfliM</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'fliM	CCCAAGCTTACGTGCGCGCTGCCAGATTG (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>dfliM</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-fliM	CAACTACATGCACCGGAATG	Chequeo de la construcción del mutante <i>dfliM</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-fliM	ACCTTGATCGCGTAGTTCGT	Chequeo de la construcción del mutante <i>dfliM</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'epsF	CGGGATCCGTGTCGACGCGAAATCGG (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>depsF</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'epsF	CCCAAGCTTGAGATCGGCCTTCAGGTTTCG (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>depsF</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-epsF	ATGAATCTGGGGCAATTCCTG	Chequeo de la construcción del mutante <i>depsF</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-epsF	GTGCCTGGCTCTCCAGGCT	Chequeo de la construcción del mutante <i>depsF</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'arsC	CGGGATCCGTTCTGTGTACCGGCAAC (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>darsC</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'arsC	CCCAAGCTTCAGGCCGACAGCTTGCCGA (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>darsC</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-arsC	GGCTCTTCCAACCCTGCGC	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsC</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-arsC	CATCGACACCGCACACGCC	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsC</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'arsB	CGGGATCCTGGTGAACCTGGCTGGTGAAG (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>darsB</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'arsB	CCCAAGCTTGTAGGCGAGCGAGGAATTGA (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>darsB</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-arsB	GTATCACAAGGAGATCGCGC	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsB</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB

3'ext-arsB	TAGGCGAGCGAGGAATTGAA	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsB</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'arsC2	CGGGATCCCGATCTACCACAACCCCAAATG (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>darsC2</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'arsC2	CCCAAGCTTGTCTGGCGCGGATGTTATGC (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>darsC2</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-arsC2	GACACCTGCGACGACATTC	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsC2</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-arsC2	AAGCGCTTCAACAAGACCTG	Chequeo de la construcción del mutante <i>darsC2</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'arxA	CGGGATCCGCTCACCCAACATCGGTATCGG (<i>Bam</i> HI)	Generación del mutante <i>darxA</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'arxA	CCCAAGCTTCATTTCTGGCGTGCGGTCTTTC (<i>Hind</i> III)	Generación del mutante <i>darxA</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'ext-arxA	CGACGTCTACACGACCAATG	Chequeo de la construcción del mutante <i>darxA</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
3'ext-arxA	GGTGTCTGATGACGAAGACCT	Chequeo de la construcción del mutante <i>darxA</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Secuenciación de fragmentos de plásmidos que portan el gen <i>lacZ</i> y chequeo de la construcción de mutantes de inserción en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Secuenciación de fragmentos de plásmidos que portan el gen <i>lacZ</i> y chequeo de la construcción de mutantes de inserción en <i>Azoarcus</i> sp. CIB
5'POLIIIHK	CGAAACGTCGGATGCACGC	Extremo 5' de un fragmento interno de 166 pb del gen <i>dnaE</i> (codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR

Materiales y métodos

3'POLIIHK	GCGCAGGCCTAGGAAGTCGAAC	Extremo 3' de un fragmento interno de 166 pb del gen <i>dnaE</i> (codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR cuantitativa
5'RTpilX	CATACTGATCACGCTGCTGG	Extremo 5' de un fragmento interno de 119 pb del gen <i>pilX</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
3'RTpilX	GATCGAGGTGGTAATTCGCG	Extremo 3' de un fragmento interno de 119 pb del gen <i>pilX</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RTpilY1	GGCGGTCATAGAAGAACTCG	Extremo 5' de un fragmento interno de 80 pb del gen <i>pilY1</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
3'RTpilY1	TGCCCCGAGGTATAAAGCATC	Extremo 3' de un fragmento interno de 80 pb del gen <i>pilY1</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RTfliM	TGTTCAACTACATGCACCGG	Extremo 5' de un fragmento interno de 120 pb del gen <i>fliM</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
3'RTfliM	GTTTGGCCAGGATGAGGTTC	Extremo 3' de un fragmento interno de 120 pb del gen <i>fliM</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RTfliO	ACGCACTGCAGCACACATC	Extremo 5' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>fliO</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
3'RTfliO	GCTCCATCGAACGCTTCAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>fliO</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RTepsF	CCAGTATGCGCATTGGTTC	Extremo 5' de un fragmento interno de 97 pb del gen <i>epsF</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
3'RTepsF	GCCGTGCTTCTGCTGATAGT	Extremo 3' de un fragmento interno de 97 pb del gen <i>epsF</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RT0819	CGACAGTAAGGTGTCGAGCAG	Extremo 5' de un fragmento interno de 103 pb del gen <i>AzCIB_0819</i> amplificado en ensayos de RT-PCR

3'RT0819	GAACCAGCGCAGCATCAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 103 pb del gen <i>AzCIB_0819</i> amplificado en ensayos de RT-PCR
5'RTarsC	GCTGTGCAGCAAGTCGTG	Extremo 5' de un fragmento interno de 94 pb del gen <i>arsC</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
3'RTarsC	CACCACCGGACAGGTCTC	Extremo 3' de un fragmento interno de 94 pb del gen <i>arsC</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
5'RTarsB	CAGTGTGAAGTCACGGGAAA	Extremo 5' de un fragmento interno de 90 pb del gen <i>arsB</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
3'RTarsB	GACGATGCACAGGAACACC	Extremo 3' de un fragmento interno de 90 pb del gen <i>arsB</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
5'RTarsC2	TCTACCACAACCCCAAATGC	Extremo 5' de un fragmento interno de 97 pb del gen <i>arsC2</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
3'RTarsC2	GGGGTCTTCAGGTATTCGATG	Extremo 3' de un fragmento interno de 97 pb del gen <i>arsC2</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
5'RTarxA	ACGAGGACGGCTACATGTTC	Extremo 5' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>arxA</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa
3'RTarxA	GTCCATCTTGTACGGCTTGC	Extremo 3' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>arxA</i> amplificado en ensayos de RT-PCR cuantitativa

3.3.- Secuenciación automática de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA polimerasa *AmpliTaq FS*, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer).

3.4.- Extracción y purificación de RNA

La purificación del RNA se realizó partiendo de las células bacterianas resuspendidas en una solución de lisozima 50 mg/ml (Sigma) en tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1 mM). A continuación, el RNA total del cultivo se aisló mediante el *High Pure RNA Isolation kit* (Roche), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Para la eliminación del DNA contaminante se empleó el *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA obtenido se analizó mediante un análisis espectrofotométrico de A_{260} y del ratio A_{260}/A_{280} , respectivamente, manteniéndose éste último siempre entre 1,8 y 2 (Nanophotometer Pearl, IMPLEN), y mediante su visualización en geles de agarosa.

3.5.- Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR) y PCR cuantitativa

Una vez extraído y purificado el RNA, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa del *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche). Cada reacción de retrotranscripción (20 μ l) contenía 1 μ g de RNA, 10 U de transcriptasa reversa, 20 U de inhibidor de RNasas, dNTPs 1 mM y 60 μ M *random hexamer primer* del kit. Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder utilizar las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en las que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. El protocolo estándar para la síntesis de cDNA consistió en una incubación de 10 min a 25 °C, seguido de un ciclo de 30 min a 55

°C y una última incubación de 5 min a 85 °C, utilizando un equipo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). Posteriormente se empleó 1 µl del cDNA obtenido como molde para la PCR posterior. El cDNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a una concentración final de 0,5 µM, y 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools). En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 1 µl de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa. Con este control se corroboró que no existía ninguna banda de amplificación indicativa de que la preparación de RNA contuviera DNA contaminante. El volumen total de la reacción de PCR fue de 50 µl y se realizaron 25 ciclos de amplificación siguiendo el programa descrito en el apartado 3.2.

Cuando se llevaron a cabo experimentos de PCR a tiempo real, se utilizó un termociclador *LightCycler®480 II Real-Time PCR Instrument* (Roche). El volumen de cada reacción fue de 20 µl, que contenían 1 µl de cDNA de la mezcla de la reacción de la retrotranscripción, 0,25 µM de la pareja de oligonucleótidos correspondiente y 10 µl de *SYBR Green Master Mix* (Roche). El gen *dnaE*, que codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III, cuya expresión se ha demostrado constitutiva a lo largo del ciclo celular (Valderrama *et al.*, 2012), fue utilizado como control interno en las reacciones de PCR a tiempo real, empleando la pareja de oligonucleótidos 5'POLIII HK/3'POLIIHK (Tabla 6). Los resultados se mostraron como cuantificaciones relativas utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 4 min), seguido de 55 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95 °C, 10 s; hibridación, 60 °C, 10 s; elongación y medida de la señal, 72 °C, 10 s). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con las mismas parejas de oligonucleótidos y con diluciones seriadas de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB.

3.6.- Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de DNA y la integridad del RNA total se utilizaron geles 0,7% o 1,5% (m/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-HCl 40mM;

ácido acético 20mM; EDTA 2 mM, pH 8), utilizando el mismo tampón como electrolito.

A las muestras se les añadió $\frac{1}{4}$ de su volumen de tampón de carga (30 % (m/v) de Ficoll 400; 0,2 % (m/v) de azul de bromofenol; 0,2 % (m/v) de xileno cianol y EDTA 40 mM pH 8,0). La electroforesis se realizó a 100 V durante 15-20 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con *Gel Red Nucleid Acid Gel Stain* (Biotium), visualizándose los fragmentos de ácidos nucleicos con radiación ultravioleta en un transiluminador.

Como marcador de tamaño se utilizó el DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *BstEII* (New England Biolabs), o la forma replicativa del fago Φ X174 digerida con *HaeIII* (New England Biolabs).

3.7.- Construcción de los plásmidos pIZacdS y pSEVA237acdS

La construcción del plásmido pIZacdS se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR del gen *acdS* (1017 pb) utilizándose la pareja de oligonucleótidos 5'RBSacdS/3'acdS (Tabla 6) y DNA genómico de *B. phytofirmans* PsJN como molde. El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pIZ1016 usando las dianas de restricción *HindIII* y *SpeI*, generándose el plásmido pIZacdS (Tabla 5).

La construcción del plásmido pSEVA237acdS se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR del fragmento Ptac-*acdS* (1171 pb) del plásmido pIZacdS empleando la pareja de oligonucleótidos 5'PtacAcidS/3'PtacAcidS (Tabla 6). El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pSEVA237 usando la diana *Ascl*, generándose el plásmido pSEVA237acdS (Tabla 5).

4.- Procedimientos de transferencia genética

4.1.- Transformación de *E. coli* mediante choque térmico o electroporación

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando dos procedimientos distintos: choque térmico y electroporación. La transformación por choque térmico

requirió la preparación previa de células competentes con RbCl (Sambrook y Rusell, 2001). La transformación por electroporación (Wirth *et al.*, 1989) se llevó a cabo en un equipo *Gene Pulser/Pulse Controller* (Bio-Rad), según las recomendaciones del fabricante, utilizando las siguientes condiciones: 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω .

4.2.- Transferencia de plásmidos a *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental

Los plásmidos se movilizaron a *Azoarcus* sp. CIB por conjugación biparental utilizando la cepa *E. coli* S17-1 λ pir como donador, siguiendo el protocolo establecido por de Lorenzo y Timmis (1994) con algunas modificaciones. Para su realización se utilizó una cantidad de células de la cepa donadora correspondiente a una A_{600} de 5; y de la cepa receptora, *Azoarcus* sp. CIB cultivada en medio mínimo MC con piruvato 0,2% (m/v), se empleó una cantidad de células correspondiente a una A_{600} de 35. Los exconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en placas de medio mínimo MC con ácido glutárico 10 mM (contraselección de la cepa donadora) y el correspondiente antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra en el plásmido. Este protocolo de conjugación se empleó tanto para la transferencia de plásmidos replicativos como de plásmidos suicidas.

5.- Construcción de cepas mutantes de inserción en *Azoarcus* sp. CIB por recombinación homóloga

Para la construcción de las cepas mutantes, *Azoarcus* sp. CIBdpilX, *Azoarcus* sp. CIBdfliM, *Azoarcus* sp. CIBdepsF, *Azoarcus* sp. CIBdarsC, *Azoarcus* sp. CIBdarsB, *Azoarcus* sp. CIBdarsC2 y *Azoarcus* sp. CIBdarxA se procedió a la interrupción insercional de los respectivos genes por recombinación homóloga (Fig. 13).

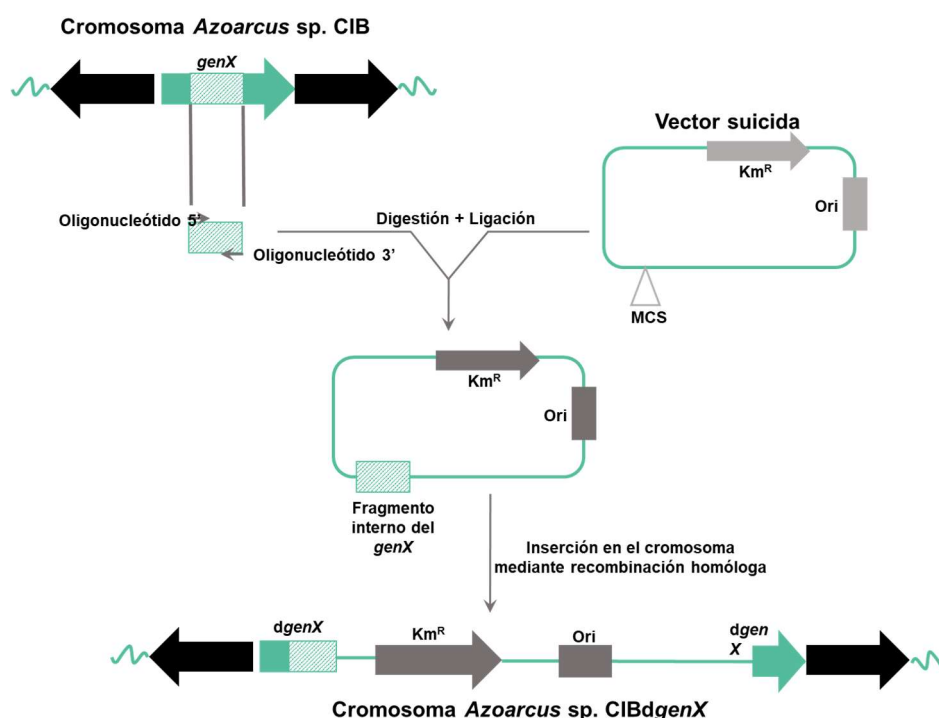


Figura 13. Estrategia seguida para la construcción de los mutantes de inserción por recombinación homóloga en *Azoarcus* sp. CIB. En la parte superior de la figura se esquematiza el cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB, incluyendo al gen que va a ser interrumpido (*genX*). Las flechas grises representan las parejas de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del fragmento interno del *genX*. El plásmido suicida que contiene el fragmento interno del *genX* es transferido a *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 4.2 de esta sección. La recombinación homóloga subsiguiente origina la interrupción del gen X y la obtención de la correspondiente cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBd*genX*. Se representan el origen de replicación (*ori*), el gen que codifica la resistencia a kanamicina (*Km^R*) y el MCS (*Multiple Cloning Site*) del vector suicida pK18*mob* utilizado en este trabajo; d, indica gen interrumpido.

Se amplificaron mediante PCR fragmentos internos de los genes diana *pilX* (525 pb), *fliM* (512 pb), *epsF* (578 pb), *arsC* (468 pb), *arsB* (557 pb), *arsC2* (551 pb) y *arxA* (493 pb), utilizando las respectivas parejas de oligonucleótidos, i.e., 5'*pilX*/3'*pilX*; 5'*fliM*/3'*fliM*, 5'*epsF*/3'*epsF*, 5'*arsC*/3'*arsC*, 5'*arsB*/3'*arsB*, 5'*arsC2*/3'*arsC2*, 5'*arxA*/3'*arxA* (Tabla 6). Los productos de amplificación se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Hind*III y se clonaron en el plásmido pK18*mob* (plásmido suicida que no replica en *Azoarcus*) previamente digerido con *Bam*HI/*Hind*III. Las construcciones resultantes pK18*mobdpilX*, pK18*mobdfliM*, pK18*mobdepsF*, pK18*mobdarsC*, pK18*mobdarsB*, pK18*mobdarsC2* y pK18*mobdarxA* (Tabla 5) fueron transferidas a la cepa donadora, *E. coli* S17-1λ*pir*, por electroporación y de la cepa donadora a la cepa receptora, *Azoarcus* sp. CIB, mediante conjugación biparental tal y como se indica

en el apartado 4.2 de esta sección. Los transconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en medio MC suplementado con kanamicina y con ácido glutárico 10 mM como fuente de carbono para la contra-selección de la cepa donadora. Los mutantes *Azoarcus* sp. CIBdpilX, *Azoarcus* sp. CIBdfliM, *Azoarcus* sp. CIBdepsF, *Azoarcus* sp. CIBdarsC, *Azoarcus* sp. CIBdarsB, *Azoarcus* sp. CIBdarsC2 y *Azoarcus* sp. CIBdarxA (Tabla 4) se comprobaron mediante la amplificación por PCR usando un oligonucleótido (F24 o R24) que flanquea el MCS (*Multiple Cloning Site*) del plásmido y un oligonucleótido externo al fragmento usado para realizar la recombinación homóloga (Tabla 6).

6.- Ensayos realizados para el estudio de la interacción *Azoarcus*-planta

6.1.- Ensayos de caracterización fenotípica de cepas de *Azoarcus* sp. CIB

6.1.1.- Solubilización de fosfatos

Para probar la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para la solubilización de fosfatos insolubles, se prepararon placas de medio MALP con agar al 1,5% (m/v). A continuación, se puso sobre la superficie de la placa una gota de 10 µl de *Azoarcus* sp. CIB, previamente crecido en medio MC-Piruvato aeróbico. Tras la incubación de las placas durante 14 días a 30°C se realizó la observación de la formación del halo de solubilización (Rodríguez *et al.*, 2000).

6.1.2.- Producción de ácido indolacético (IAA)

Se estimó la producción IAA mediante el método colorimétrico con reactivo de Salkowski (Salkowski, 1885). Para ello, se cultivaron las bacterias en medio MC suplementado con 2,5 mM de *L*-triptófano (precursor de la síntesis de IAA) durante 48 h a 30°C. Se monitorizó la producción de IAA a lo largo de la curva de crecimiento tomando 1 ml de sobrenadante de cultivo y mezclándolo con 1 ml de reactivo de Salkowski (FeCl₃ 12 g/l disuelto en H₂SO₄ 7,9 M). La mezcla se incubó durante 30 min a 25°C y se midió la A₅₃₀ en un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. Se estimó la cantidad de IAA producida en cada muestra mediante su

extrapolación en una curva de calibrado realizada con un patrón de IAA (Sigma) (Glickmann y Dessaux, 1995).

6.1.3.- Ensayos de movilidad

Los ensayos de movilidad tipo *swimming* se realizaron en placas de medio VM-agar semisólido (0,3% agar) utilizando cultivos crecidos en medio líquido VM hasta una A_{600} de 0,6.

Para la movilidad de tipo *swarming* se emplearon placas de medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) y agar semisólido (0,4% agar) utilizando cultivos crecidos en medio líquido MC con piruvato al 0,2% (m/v) hasta una A_{600} de 0,6.

Las placas se incubaron durante 7 días a 30°C, tras lo cual se midió el diámetro de los halos de crecimiento de las diferentes cepas de *Azoarcus* sp. CIB testadas.

6.1.4.- Morfología de colonia

El estudio morfológico de las colonias de *Azoarcus* sp. CIB se realizó en placas de medio VM suplementadas con 0,5 g/l de colorante Rojo Congo (Sigma-Aldrich). Las diferentes cepas de estudio se cultivaron en medio VM hasta una A_{600} de 0,6. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina (0,85%) y se sembraron en las placas de VM-Rojo Congo. Las placas se incubaron durante 7 días a 30°C y se analizó la morfología de colonias aisladas en una lupa Leica MZ16FA.

6.2.- Ensayos enzimáticos

6.2.1.- Ensayo de fijación de nitrógeno

Se midió la actividad nitrogenasa mediante el método de reducción del acetileno a etileno (Bedmar y Olivares, 1979). Las células de *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron anaeróbicamente en medio MC hasta la mitad de la fase exponencial. Posteriormente, se resuspendieron en medio MNF, tanto en presencia como en ausencia de amonio como fuente de nitrógeno, a una A_{600} de 0,4. A continuación, se tomaron 30 ml de *Azoarcus* sp. CIB en tubos de 100 ml cerrados herméticamente con tapones perforables, sustituyéndose 10 ml de aire de su

interior por 10 ml de acetileno. Por último, se tomaron muestras de gas cada 15min, 1 h, 4 h, 24 h y 48 h para analizar su contenido en etileno y acetileno usando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer según el procedimiento descrito anteriormente (Fernández-Pascual *et al.*, 1988).

6.2.2.- Ensayo de actividad ACC desaminasa

La actividad ACC desaminasa se determinó midiendo, colorimétricamente, la acumulación de α -cetobutirato, formado en la reacción enzimática de la ACC desaminasa sobre el ACC según el método descrito por Penrose y Glick (2003) con algunas modificaciones. Las células se crecieron hasta final de la fase exponencial y se resuspendieron en 7,5 ml de medio mínimo DF con ACC a una concentración final de 3 mM como única fuente de nitrógeno (fase de inducción de la actividad ACC desaminasa en las cepas silvestres). Tras la incubación a 30 °C durante 24 horas, se lavaron las células con Tris-HCl (pH 7), se resuspendieron en 1,5 ml del mismo tampón y se lisaron con 30 μ l de tolueno. El ensayo enzimático se realizó tomando 200 μ l del extracto celular que se incubó 15 min a 30 °C con 20 μ l de ACC 0,5M. Tras la incubación, se añadió 1 ml de HCl 0,56 M, se centrifugó 5 min a 20.000 g y se tomó 1 ml del sobrenadante que se incubó de nuevo durante 30 min a 30 °C con 800 μ l de HCl 0,56 M y 300 μ l del reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina. Finalmente, se añadieron 2 ml de NaOH 2M y se midió la A_{540} en un espectrofotómetro Shimadzu UV-260.

La concentración de α -cetobutirato se determinó extrapolando los valores de absorbancia A_{540} obtenidos a una recta patrón de cantidades conocidas de α -cetobutirato. La concentración de proteína se estimó mediante el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

6.2.3.- Ensayo de actividad superóxido dismutasa en arroz

Las muestras de arroz (50 mg) fueron recolectadas e, inmediatamente, congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C. Los tejidos congelados fueron homogeneizados en tampón 0,1 M Tris-HCl (pH 7,8) conteniendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM y un 4% de polivinilpirrolidona. Tras la homogeneización se centrifugaron las muestras durante 10 min a 20.000 g y a 4 °C.

El análisis de la actividad SOD se basó en monitorizar la inhibición competitiva de la reducción del citocromo c por el anión superóxido, midiendo la A_{550} de la reacción, según el protocolo descrito por McCord y Fridovich (1969). Para ello, se preparó 1 ml de la reacción inicial a 25 °C en tampón 50 mM KH_2PO_4 (pH 7) conteniendo EDTA 1 mM, citocromo c 0,1 mM, xantina 0,5 mM y xantina oxidasa ~5 U/ml y el incremento de la A_{550} se comparó con la misma reacción suplementada con 100 μl del homogeneizado de raíz de arroz. En este ensayo enzimático se define una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de SOD necesaria para inhibir un 50% la reducción del citocromo c (McCord y Fridovich, 1969).

6.3.- Ensayos *in vivo* con arroz

6.3.1.- Inoculación de plántulas de arroz

Las semillas de *O. sativa* L. variedad GLEVA se desinfectaron superficialmente utilizando una solución de hipoclorito sódico al 1% (v/v) durante 30 min a 25 °C en agitación. Tras tres lavados de 10 min cada uno con agua estéril, se germinaron en oscuridad a 30 °C sobre placas de agar 1,5% (m/v). Una vez germinadas, se prepararon los inóculos bacterianos crecidos en medio VM a 30 °C hasta obtener una A_{600} de 0,6. Se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con solución salina (0,85% NaCl) estéril, utilizándose esta suspensión bacteriana para regar las semillas en condiciones asépticas. Tras la inoculación, las plántulas se crecieron a 25 °C con un ciclo aproximado de 10 h de luz y 14h de oscuridad durante 10 días.

6.3.2.- Recuperación y cuantificación de endófitos

Las plántulas de arroz se recolectaron 5 días después de su inoculación con cepas bacterianas portadoras del plásmido pSEVA237. Se pesó su raíz, procediéndose a su desinfección superficial mediante inmersión durante 3 minutos en una solución al 1% (v/v) de hipoclorito de sodio y tres lavados con agua estéril. A continuación, las raíces se homogeneizaron añadiendo 1 ml de solución salina (0,85% NaCl) a un *Potter-Elvehjem* (Gyaneshwar *et al.*, 2001). Una vez obtenido el extracto se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio VM (1,5% de agar) suplementadas con kanamicina con el fin de determinar el

número de UFC que contienen el plásmido pSEVA237. Además, la expresión de GFP en las colonias resistentes a kanamicina obtenidas fue confirmada mediante una lupa Leica MZ16FA.

6.3.3.- Ensayos de crecimiento de arroz inoculado con *Azoarcus* sp. CIB en cámara de cultivo

Las semillas de arroz, desinfectadas superficialmente, se germinaron e inocularon con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 6.3.1. Tras la inoculación, se plantó el arroz en tiestos con vermiculita como sustrato y se regó con medio estéril Hoagland's No.2 (Sigma-Aldrich) en el que se resuspendieron células bacterianas a una A_{600} de 0,6. Como control se germinaron y cultivaron plantas de arroz sin inocular en las mismas condiciones. Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con las siguientes características: fotoperiodo de 18 h de luz y 8 h de oscuridad; temperatura regulada a 25 °C durante el día y 22 °C durante la noche, y una humedad del 75% por el día y del 80% por la noche. En el momento de la cosecha, se separó la raíz de la parte aérea y se tomaron medidas de longitud y peso fresco de cada planta.

6.3.4.- Ensayos de crecimiento de arroz en invernadero

Las plantas fueron germinadas e inoculadas con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y *Azoarcus* sp CIB (pSEVA237 $acdS$) de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 6.3.1. Tras 24 h desde la inoculación, se plantaron los brotes de arroz en tubos de ensayo con medio Hoagland's No.2 (Sigma-Aldrich) semisólido (0,4% agar) suplementado, cuando fue necesario, con $CdCl_2$ 20 μM o 50 μM . Para evitar la desecación, las plantas fueron regadas cada 5 días con medio estéril Hoagland's No.2 (Sigma-Aldrich), con o sin cadmio, en el que se resuspendieron células bacterianas a una A_{600} de 0,6. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, a una temperatura de 30°C durante 15 días. Como control se germinaron y cultivaron plantas de arroz sin inocular en las mismas condiciones.

6.4.- Análisis transcriptómico de *Azoarcus* sp. CIB en presencia de extractos de arroz

6.4.1.- Obtención de los extractos de raíz de arroz y preparación de las muestras de RNA

El análisis transcriptómico se realizó a partir de RNA de *Azoarcus* sp. CIB obtenido de células incubadas en presencia de extractos estériles de raíz de arroz. Los extractos se obtuvieron a partir de raíces de plántulas de arroz que, tras su germinación en placas de agar a 30 °C en oscuridad, se cultivaron en placas de medio Hoagland's (1,5% agar) durante 10 días a 25 °C con un fotoperiodo aproximado de 10 h de luz y 14 h de oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se aislaron las raíces (0,5 g) y se homogeneizaron en 30 ml de solución salina 0,85% (m/v). Una vez homogeneizadas, se procedió a una primera centrifugación de 5 min a 4000 rpm para eliminar los restos celulares más grandes. Posteriormente, se procedió a sucesivos filtrados utilizando filtros *Minisart*® (Sartorius) de 0,22 y 0,1 µm de tamaño de poro. Los extractos de raíz se utilizaron justo después de su preparación para evitar la degradación de posibles compuestos lábiles.

La preparación de las células de *Azoarcus* sp. CIB se realizó a partir de un cultivo crecido en medio VM hasta una A_{600} de 0,6. Para evitar la presencia de trazas del medio de cultivo se realizaron 3 lavados en solución salina al 0,85% (m/v). A continuación, las células se resuspendieron en los extractos de raíz de arroz a una A_{600} de 0,6 o, en el caso de las muestras control, en solución salina 0,85%. Las diferentes muestras, por triplicado, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con una suave agitación (50 rpm). Finalmente, se recuperaron las células mediante centrifugación y se procedió a la extracción del RNA según el protocolo descrito en el apartado 3.4. Se realizó un control de calidad del RNA en un bioanalizador *Agilent 2200 Tape Station System*, obteniéndose un valor de integridad del RNA (RIN) cercano o mayor a 7.

6.4.2.- Construcción de las librerías de cDNA, secuenciación y análisis bioinformático

Se construyeron librerías de cDNA de 6 muestras independientes, *i.e.*, 3 muestras de RNA extraído de células de *Azoarcus* sp. CIB incubadas en presencia

de extractos de arroz, y 3 muestras control de RNA extraído de células de *Azoarcus* sp. CIB incubadas en solución salina. Tanto la construcción de las librerías como la secuenciación y el curado informático de los datos se realizó en el *Beijing Genome Institute* (BGI; Hong-Kong, China),

La secuenciación se llevó a cabo utilizando la tecnología *Illumina HiSeq™ 4000*, asegurando un mínimo de 10 millones de lecturas por muestra. Las secuencias obtenidas se mapearon en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB (*GenBank* CP011072) usando el programa *SOAPaligner/SOAP2* (Li *et al.*, 2009). Los niveles de expresión génica se calcularon utilizando los valores de RPKM (*Reads Per Kilobase per Million reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008). Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron identificados por el algoritmo desarrollado por Audic y Claverie (Audic y Claverie, 1997), obteniéndose un *p-value* para cada gen comparado entre las dos condiciones de estudio. A continuación, se realizaron las valoraciones estadísticas mediante el análisis FDR (*False Discovery Rate*) (Yekutieli y Benjamini, 2001). Así, se consideró un gen diferencialmente expresado aquél que presentó un valor de *Fold Change* mayor de 2 y un valor de $FDR \leq 0,001$. Además, para el estudio de la expresión diferencial entre condiciones se realizó un análisis NOIseq (Tarazona *et al.*, 2012), tomando como válido un valor de probabilidad $\geq 0,8$, con el cual se agruparon los DEGs comunes a las tres réplicas biológicas de cada condición.

La clasificación de los DEGs en sus correspondientes categorías de grupos de ortólogos, COG (*Clusters of Orthologous Groups*), se realizó con el programa RPSBLAST del servidor WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomic-analysis/server/cog/>).

7.- Ensayos de reducción de selenito/telurito y producción de SeNPs y TeNPs

7.1.- Monitorización de la producción de SeNPs y TeNPs

La apariencia de los cultivos de *Azoarcus* sp. CIB en presencia de selenito o telurito se monitorizó a lo largo de la curva de crecimiento, observándose el

cambio de coloración del medio. La concentración de selenito/telurito remanente en el medio de cultivo fue determinada mediante espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) utilizando un equipo *Perkin Elmer Optima 2100 DV* (Nawaz *et al.*, 2015).

Para determinar la fracción del cultivo celular responsable de la reducción de selenito a Se^0 se creció anaeróbicamente en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) la cepa CIB hasta el final de la fase exponencial. Las células se recogieron por centrifugación durante 1 min a 14.000 rpm, separándose el sobrenadante y el sedimento celular. A continuación, las células fueron resuspendidas en un volumen equivalente de solución salina (0,85%) y lisadas por sonicación para obtener así el extracto crudo. Una fracción del sobrenadante y del extracto crudo se calentó a 100 °C durante 10 min mientras la otra fracción fue mantenida a temperatura ambiente. Se añadió selenito 1 mM a cada fracción y se determinó la aparición del compuesto anaranjado. La concentración de proteína total se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para la producción de SeNPs con cultivos de *Azoarcus* sp. CIB en condiciones de *resting cell* se crecieron las células anaeróbicamente en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) y se recogieron 80 ml a una A_{600} de 0,8 mediante centrifugación. A continuación, se lavaron dos veces con tampón HEPES 50 mM pH 7,5 y se resuspendieron en 40 ml del mismo tampón. Se añadió selenito a una concentración final de 1 mM y la mitad de la suspensión de células se incubó a 30 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas, mientras que la otra mitad se incubó aeróbicamente con agitación durante el mismo periodo de tiempo. Tras la incubación se recogieron las células por centrifugación para ser analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La producción química de SeNPs con glutatión se realizó a temperatura ambiente mediante una adaptación del protocolo publicado por Ramos y Webster (2012). Para ello se prepararon 6 ml de una solución 25 mM de selenito y se añadió 2 ml de una solución 100mM de glutatión reducido. A continuación, se basificó la reacción con 0,66 ml de NaOH a una concentración 1 M y de forma casi inmediata se obtuvo una intensa coloración naranja, sugiriendo la rápida reducción del selenito a Se^0 . Las muestras se observaron inmediatamente mediante TEM.

Para la producción de SeNPS con extractos celulares, las bacterias se incubaron anaeróbicamente hasta el final de la fase estacionaria, se lavaron y resuspendieron en solución salina (0,85%) estéril. Los extractos celulares se obtuvieron por sonicación (4 ciclos de 30 s a la máxima intensidad de un sonicador Branson 150). A continuación, se tomaron 600 µl del extracto celular y se incubó aeróbicamente a 30 °C durante 24 h en presencia de selenito 1 mM. Se observó la indicativa coloración naranja y las SeNPs se caracterizaron mediante TEM.

7.2.- Purificación de las SeNPs

La purificación de nanopartículas de selenio se llevó a cabo siguiendo una modificación del protocolo descrito anteriormente por Bahrami y colaboradores (2012). Se tomaron 10 ml de cultivos bacterianos, crecidos en medio MC con piruvato 0,2% (m/v) suplementado con selenito 1mM durante 7 días, y se lisaron utilizando una prensa de French (20000 psi, Aminco Corp.). Tras la lisis celular, el cultivo se centrifugó durante 5 min a 14.000 *g*, descartando el sobrenadante y realizando tres lavados del sedimento con una solución de SDS 0,5% y Tris-HCl 1,5 M, pH 8,5. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 14.000 *g*, resuspendiendo posteriormente el sedimento en 4 ml de H₂O destilada y 2 ml de *n*-octil alcohol. Posteriormente, se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación durante 15 min a 5.000 *g*, manteniéndose el tubo de centrifugación vertical durante 24 h a 4 °C. Las nanopartículas precipitadas tras la última incubación a 4 °C se resuspendieron en H₂O para su caracterización microscópica.

8. Técnicas de microscopía

8.1.- Microscopía óptica de epifluorescencia y confocal

Para la visualización *in vivo* de las cepas bacterianas que expresan la proteína GFP interaccionando con raíces de arroz, se tomaron muestras de raíz a los 5 y 10 días tras la inoculación. A continuación, se lavaron con agua para retirar las células no adheridas y se montaron en un portaobjetos para su inmediato examen microscópico. Para la microscopía de epifluorescencia se utilizó un equipo Leica AF6000 LX con un objetivo 100x, equipado con una cámara monocroma

Hamamatsu CCD C9100-02 de alta resolución. Para la microscopía confocal se utilizó un microscopio Leica TCS-SP5-AOBS-UV CLSM con un objetivo de 100x. Las proyecciones del plano xyz se obtuvieron a partir de imágenes individuales a un intervalo de 1 μm y fueron analizadas mediante el *software* Leica LCS®. En ambos casos se excitó con una longitud de onda de 488 nm y se recogió la emisión en un rango de 500-547 nm.

8.2.- Microscopía electrónica

8.2.1.- Microscopía electrónica de transmisión de inclusiones de *Azoarcus* sp. CIB-raíz de arroz e inmunolocalización de NifH

Se tomaron muestras de raíz de arroz (0,5-1 cm) inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB durante 7 días para su fijación en resina LR White (London Resin Corporation) según el protocolo descrito en Fernández-Llamosas *et al.* (2014). Tras su fijado, se realizaron dos preparaciones de las inclusiones: (i) secciones de 1 μm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina 1% (m/v) en borato de sodio (de María *et al.*, 2005) para su observación mediante microscopía óptica, y (ii) secciones ultrafinas (70-80 nm) obtenidas con un ultramicrotomo Reicher para observación mediante TEM. .

Para la inmunolocalización se utilizaron anticuerpos anti-NifH, cedidos por el Dr. Imperial (Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, UPM-INIA), marcados con oro coloidal. La inmunolocalización se realizó sobre las secciones ultrafinas según el procedimiento descrito por de Lorenzo *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Las secciones se pusieron en contacto durante 1 h a 37°C con tampón TBS-BSA formado por una solución de TBS (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20; pH 7,4) suplementada con 20 mg/ml de BSA. Posteriormente, se incubaron durante 2 h a 37°C con el anticuerpo primario anti-NifH, en una dilución 1:500, en el mismo tampón TBS-BSA. Tras ello, las células se lavaron (cinco veces durante 3 min) con tampón TBS-BSA (2 mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con anticuerpos IgG de cabra anti-conejo conjugados a oro coloidal (Gar 15nm; Bio-cell) diluidos 1:40 en TBS-BSA (20 mg/ml). Por último, se realizaron tres tipos de lavados consecutivos: (i) cinco veces durante 3 min con tampón TBS-BSA (20 mg/ml), (ii) tres veces durante 3 min con

el mismo tampón añadiendo 0,05% Tritón X-100 y (iii) 3 min con agua destilada. A continuación, las preparaciones se tiñeron durante 1 min con 2% de acetato de uranilo en agua y citrato de plomo (Reynolds, 1963) y, por último, las muestras se observaron con un equipo STEM-LEO 910 operando a 80 kV.

8.2.2.- Microscopía electrónica de transmisión y análisis de difracción de rayos X para la caracterización de SeNPs y TeNPs

Las muestras de cultivos bacterianos crecidos en presencia de metaloides se prepararon, para su observación directa al TEM, colocando gotas del cultivo a analizar sobre gradillas de cobre recubiertas de carbono. La observación por TEM se realizó con un microscopio JEOL JEM-2100 operando a un voltaje de 200 kV. La composición química de las SeNPs observadas se determinó mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) (Li *et al.*, 2014).

Para la observación de nanopartículas en el interior celular mediante TEM se realizaron fijaciones de células crecidas en presencia de selenito o telurito. Las muestras se procesaron en el servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas siguiendo un protocolo previamente estandarizado: los *pellets* de los cultivos se recogieron mediante centrifugación (1 min a 14.000 rpm), se lavaron tres veces con solución salina (0,85%) y se fijaron con glutaraldehído 3% en solución salina (0,85%), dejando reposar una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a cabo 5 lavados con solución salina (0,85%) y una post-fijación con tetróxido de osmio (1%) y ferrocianuro potásico (1,5%), incubándose una hora a 4 °C. A continuación, se realizaron 4 lavados con PBS y se procedió a realizar 2 ciclos de deshidratación con mezclas de etanol/agua al 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (v/v) durante 10 min en cada paso. Después de la deshidratación se procedió a la inclusión de las muestras en resina LR-White de manera secuencial. Las mezclas constituidas de etanol/resina se incuban primero en una mezcla 2:1 durante una hora, tras lo cual se pasó a una mezcla 1 etanol:1 resina durante una noche, después a una mezcla 1 etanol:2 resina durante 8 horas y por último sólo a resina durante otra noche. Por último, se encapsularon las muestras en resina y ésta se dejó polimerizar durante 48 h a 60 °C. Los cortes ultrafinos se llevaron a cabo utilizando un ultramicrotomo Reicher y se tiñeron con

acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo. Las preparaciones se observaron en un equipo JEOL1230 operando a 80kV.

8.3.- Microscopía electrónica de barrido

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras fueron filtradas con un filtro Minisart® de tamaño de poro de 0,22 µm (Sartorius) y posteriormente deshidratadas sucesivamente con mezclas de acetona/agua al 30%, 50% y 70% (v/v), respectivamente, e incubadas 24 h a 4 °C en una solución al 90% (v/v) de acetona. Tras su secado a punto crítico, las muestras se tiñeron con grafito y oro y se examinaron con un microscopio JEOL JSM-6330 F.

9.- Recursos informáticos

9.1.- Análisis bioinformáticos

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con los siguientes programas y servidores: *Chromas 2.01* (Technelysium Pty Ltd.) para el análisis de cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; *ApE 2.0.52* (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) para el análisis de secuencias y diseño de experimentos de ingeniería genética; *Gene Runner 3.05* (Hastings Software Inc.) para el diseño y análisis de oligonucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los programas BlastN y BlastP, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). El servidor seleccionado para ejecutar estos algoritmos fue el del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La comparación de parejas de secuencias proteicas se realizó con el programa *Blast2sequences* a través del servidor del NCBI, mientras que para los alineamientos múltiples de secuencias se empleó el programa ClustalOmega desde el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Como genoma de referencia de *Azoarcus* sp. CIB se empleó la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (número de acceso en *GenBank*

CP011072). Para el análisis de genes se utilizó la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa y Goto, 2000).

Los estudios filogenéticos se realizaron mediante la herramienta Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>), empleando el algoritmo MUSCLE para el alineamiento múltiple de secuencias y Gblocks para el curado de dichos alineamientos. Los filogramas se construyeron empleando un procedimiento bootstrap (100 replicados) y un modelo de sustitución WAG (Dereeper *et al.*, 2008).

9.2.- Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con el programa *IBM SPSS Statistics 24*, realizando un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre medias de los ensayos. El test de Bonferroni se empleó para asegurar las diferencias significativas entre condiciones. Las diferencias estadísticas se representan como $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,05$ (*).

VI. RESULTADOS

1.- Estudio de la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para vivir como endófito

Como se ha indicado en la Introducción, dentro del género *Azoarcus* se han identificado dos grupos filogenéticos: (i) microorganismos aislados de suelos o raíces, degradadores aeróbicos de compuestos aromáticos y adaptados a vivir como endófitos de arroz y otras gramíneas; (ii) bacterias de vida libre, aisladas principalmente de suelos contaminados, desnitrificantes y degradadores de compuestos aromáticos en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (Reinhold-Hurek y Hurek, 2000; Rabus, 2005; Martín-Moldes *et al.*, 2015; Faoro *et al.*, 2017). Al inicio de esta tesis doctoral no se había descrito ninguna especie del género *Azoarcus* especializada en la degradación de compuestos aromáticos en anaerobiosis y capaz de vivir en la endosfera de la planta. Sin embargo, se habían descrito cepas del género *Azoarcus* capaces de vivir como endófitos que habían sido aisladas de suelos libres de raíces (Laguerre *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2013). Por otro lado, en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB se han identificado genes que se han descrito en otros organismos como necesarios para la colonización de la planta, tales como los que codifican los *pili* tipo IV, el flagelo, varios sistemas de secreción, o los implicados en la fijación de nitrógeno (Hardoim *et al.*, 2015; Martín-Moldes *et al.*, 2016). Por todo ello, se decidió investigar si *Azoarcus* sp. CIB podría establecerse como endófito de plantas, eligiéndose el arroz como modelo de hospedador para la interacción tal y como se ha venido realizando con otras especies endófitas del género (Reinhold-Hurek y Hurek, 2000; Faoro *et al.*, 2017).

1.1.- Aislamiento de *Azoarcus* sp. CIB del interior de raíces de arroz

Estudios previos llevados a cabo con endófitos han demostrado que la proteína fluorescente verde (GFP) es un buen marcador para el seguimiento y visualización de la colonización bacteriana de la planta (Egener *et al.*, 1998; Germaine *et al.*, 2004). Por ello, en los estudios de colonización de raíz que a continuación se detallan se utilizó una cepa de *Azoarcus* sp. CIB portadora del plásmido pSEVA237, el cual expresa constitutivamente el gen que codifica la proteína GFP (Tabla 5).

Resultados

En primer lugar, se analizó la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para vivir como endófito cuantificando la presencia de la cepa CIB en la endosfera de raíces de arroz. Para ello se inocularon, en condiciones gnotobióticas, plántulas de arroz con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y con dos cepas control: (i) *A. communis* SWub3 (pSEVA237), microorganismo que ha sido descrito previamente como endófito de arroz (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993); y (ii) *E. coli* CC118 (pSEVA237), una cepa que no ha sido descrita como endófito de arroz. Las raíces fueron procesadas a los 5 días de realizarse la inoculación tal y como se describe en Materiales y Métodos. Mientras que las cepas *A. communis* y *Azoarcus* sp. CIB mostraron en torno a 1×10^5 UFC/g de raíz y 6×10^4 UFC/g de raíz, respectivamente, apenas se recuperaron UFC de *E. coli* en las placas analizadas (Fig. 14). Este resultado sugiere la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para colonizar internamente la raíz de arroz.

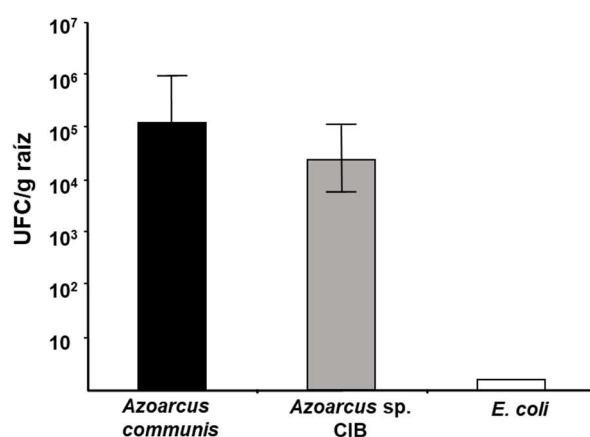


Figura 14. Cuantificación de bacterias endófitas extraídas de raíces de arroz. Se inocularon plántulas de arroz con las cepas *A. communis* SWub3, *Azoarcus* sp. CIB y *E. coli* CC118, todas ellas portadoras del plásmido pSEVA237 que expresa constitutivamente el gen reportero *gfp*. Las plantas se crecieron a 25 °C durante 5 días, tras lo cual se contabilizaron las bacterias presentes en el interior de las raíces de arroz (ver sección 6.3 Materiales y Métodos). En el gráfico se muestran los valores de UFC por gramo de raíz (peso fresco) de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

1.2.- Visualización *in planta* de *Azoarcus* sp. CIB

Para confirmar los resultados presentados en el anterior apartado, se procedió a la observación directa de la bacteria dentro del tejido radicular utilizando técnicas de microscopía.

La primera técnica microscópica empleada para la observación *in planta* de la cepa CIB fue la microscopía de epifluorescencia. Para ello se utilizaron preparaciones de raíces inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237), superficialmente desinfectadas y procesadas, a los 5 días (Fig. 15A) y 10 días de la inoculación (Fig. 15B). Las bacterias se localizaron a lo largo de toda la raíz en agrupaciones, observándose principalmente en las zonas próximas al crecimiento de los pelos radiculares (Fig. 15A). Es interesante destacar el cambio morfológico que se observa a lo largo del tiempo. Así, *Azoarcus* sp. CIB presenta una morfología de tipo bacilar, similar a la del cultivo planctónico, a los 5 días de la inoculación (Fig. 15A y 15B), mientras que transcurridos 10 días se observan células más cortas y redondeadas (Fig. 15C y 15D).

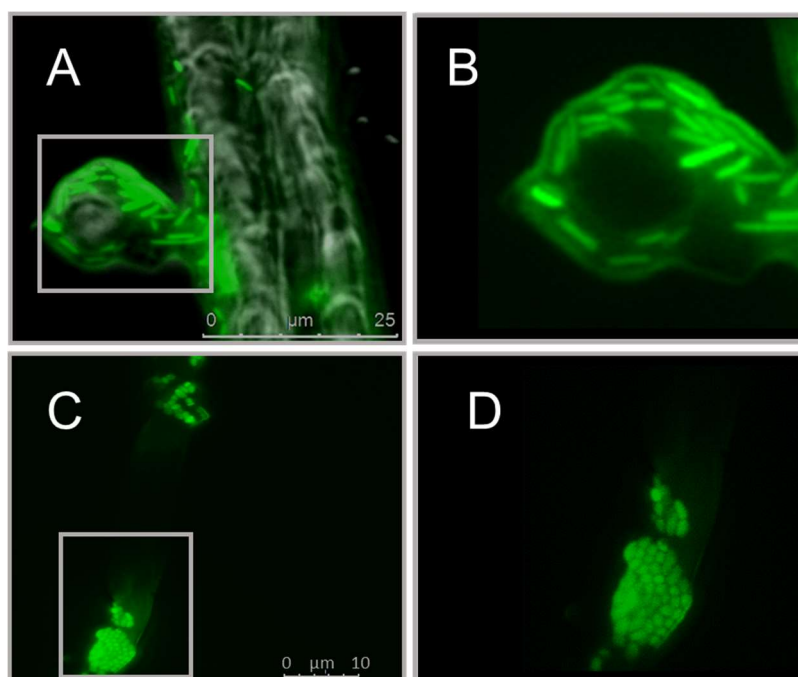


Figura 15. Raíces de arroz inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237). Imágenes de microscopía de epifluorescencia de raíces inoculadas con la cepa CIB a los 5 días (paneles A y B) y 10 días (paneles C y D) tras la inoculación. En los paneles derechos (B, D) se muestra una ampliación de las imágenes recuadradas en los paneles A y C en las que se puede observar en detalle la morfología de las bacterias.

Las imágenes de microscopía de epifluorescencia no permiten discernir si las células de la cepa CIB se encuentran en los tejidos internos de la raíz o simplemente fuertemente adheridas al rizoplasma. Para poder confirmar la presencia de *Azoarcus* sp. CIB en el interior de la raíz se empleó la técnica de microscopía confocal (Fig.16). Para estos experimentos se tomaron raíces que

Resultados

habían sido inoculadas con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) 7 días antes. Se pudo observar, de nuevo, la distribución predominante de las bacterias en agrupaciones, principalmente en los espacios intercelulares de la exodermis (Fig. 16A). La proyección xyz de las imágenes obtenidas nos muestra que las bacterias se distribuyen de mayor a menor concentración desde el exterior hacia los tejidos más internos de la raíz (Fig. 16B).

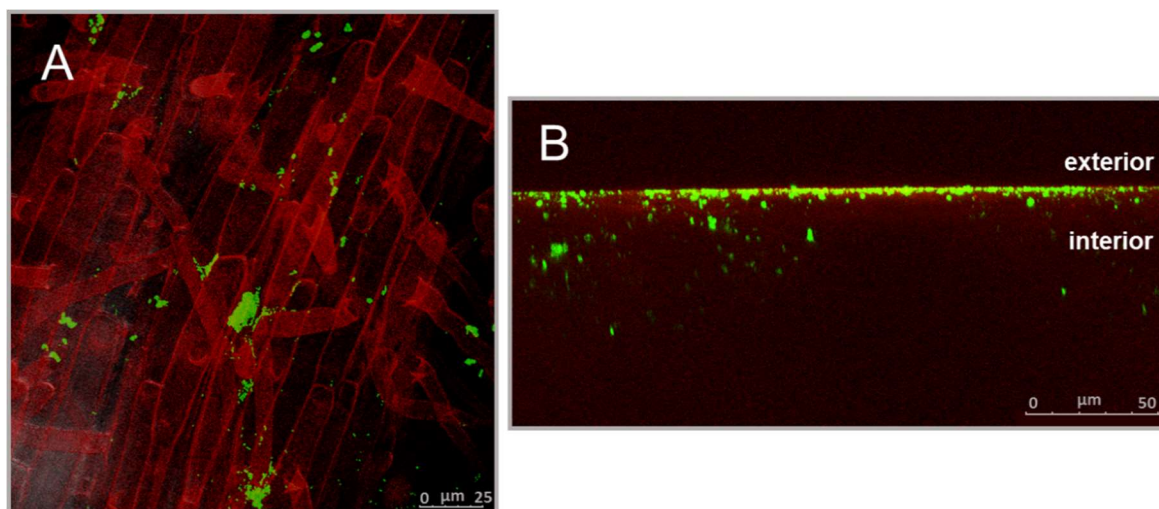


Figura 16. Colonización de las raíces de arroz por *Azoarcus* sp. CIB. Imágenes de microscopía confocal de las raíces de arroz a los 7 días tras la inoculación con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237). **A)** Las bacterias se distribuyen como células independientes o en agrupaciones en los espacios intercelulares de la exodermis radicular. **B)** Proyección xyz de la distribución de las células bacterianas desde la superficie al interior de la raíz de arroz.

Para confirmar estas observaciones y determinar la localización exacta de *Azoarcus* sp. CIB en los tejidos internos se realizaron preparaciones de raíces de arroz inoculadas con la cepa CIB en condiciones gnotóbicas y recogidas a los 7 días después de la inoculación. Para su visualización mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron fijadas, incluidas en bloques, cortadas y observadas al TEM, tal y como se detalla en el apartado 8.2.1 de Materiales y Métodos. Como paso previo a la observación por TEM, se visualizaron las inclusiones por microscopía óptica, permitiendo confirmar la distribución mayoritaria de las células bacterianas en los espacios intercelulares de la rizodermis y en las primeras capas de la exodermis (Fig.17A), aunque también se identificaron algunas bacterias en capas más profundas de la exodermis, en la zona de contacto con el parénquima (Fig.17B). No se detectaron

bacterias en las muestras que no fueron previamente inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB, lo que confirma que las células observadas corresponden a la cepa CIB.

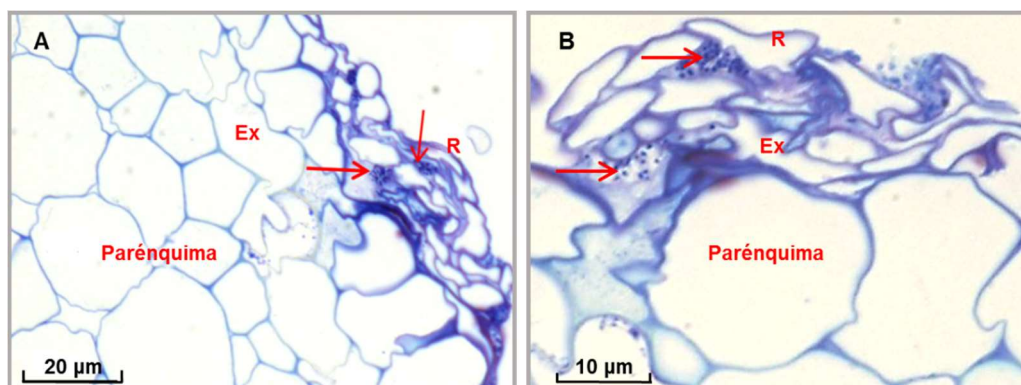


Figura17. Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de raíces de arroz inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB. Las raíces se procesaron a los 7 días tras la inoculación. **A)** Colonización de los espacios intercelulares de la rizodermis, así como de la segunda y tercera capa de la exodermis. **B)** Colonización intercelular de capas internas de la exodermis en contacto con el parénquima. Ex, exodermis; R, rizodermis.

Con la finalidad de identificar mediante inmunolocalización las células de la cepa CIB en el interior de los tejidos de la raíz del arroz, las muestras preparadas para TEM se incubaron con anticuerpos anti-NifH, que a su vez se marcaron con un anticuerpo secundario unido a oro coloidal (Fig. 18), de acuerdo al protocolo descrito en la sección 8.2.1 de Materiales y Métodos. NifH es una de las proteínas constituyentes de la nitrogenasa y es previsible que las células de CIB la estén expresando cuando viven como endófito, tal y como ya se ha observado en *Azoarcus* sp. BH72 (Egener *et al.*, 1999). En las imágenes obtenidas con TEM, las bacterias se inmunolocalizaron en los espacios intercelulares de la exodermis (Fig. 18 C y D) y en las zonas más internas junto al parénquima (Fig. 18 E y F). Es destacable que la mayor concentración de bacterias se encuentra en las capas más internas de la raíz, esto puede deberse al hecho de que la síntesis de NifH es un proceso dependiente de oxígeno (Dixon, 1998) por lo que las capas internas de la exodermis presentan una mayor expresión del complejo de la nitrogenasa debido a una menor disponibilidad de oxígeno.

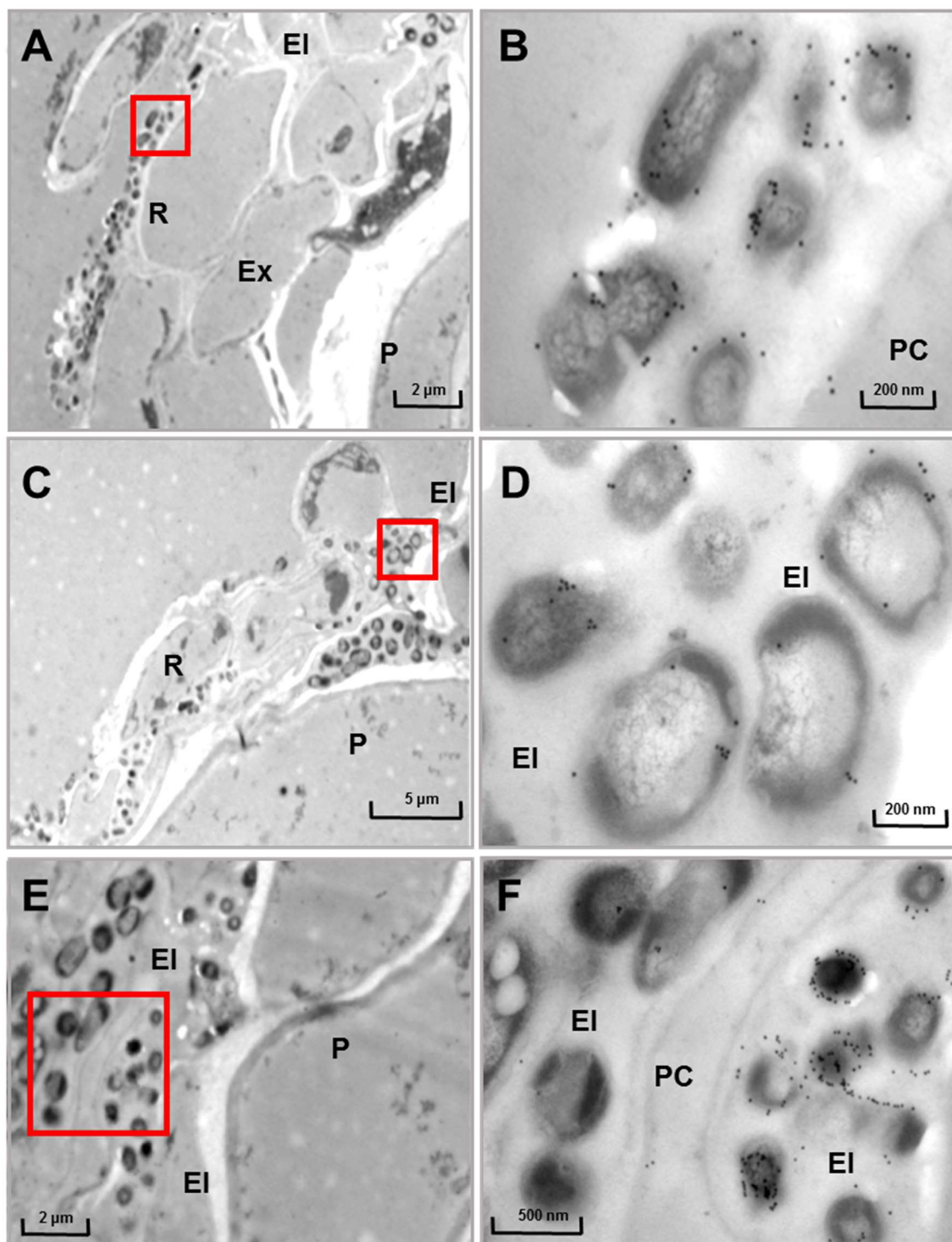


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de raíces de arroz colonizadas por *Azoarcus* sp. CIB. Las raíces se procesaron a los 7 días tras la inoculación. Para localizar las células se emplearon anticuerpos anti-NifH y el complejo NifH-anticuerpo se detectó mediante anticuerpos secundarios unidos a oro coloidal. **A)** Colonización superficial y de la rizodermis. **C)** colonización de los espacios intercelulares de la segunda y tercera capa de la exodermis. **E)** colonización de las capas más internas de la exodermis, en contacto con el parénquima. Para una observación detallada de las bacterias inmunolocalizadas, en los paneles de la derecha (**B**, **D** y **F**) se presenta una ampliación de la zona recuadrada en su respectivo panel izquierdo. EI, espacio intercelular; Ex, exodermis; P, parénquima; PC, pared celular; R, rizodermis.

2.- Caracterización de las propiedades PGP de *Azoarcus* sp. CIB

Tal y como se ha apuntado en la Introducción, se han descrito tanto en bacterias endorrizosféricas como del rizoplaneo y la exorrizosfera algunas características y propiedades asociadas de forma directa al estímulo del desarrollo de la planta hospedadora (propiedades PGP) (Gaiero *et al.*, 2013). A continuación, se detallan algunas de las propiedades de fitoestimulación y biofertilización que se han estudiado en *Azoarcus* sp. CIB.

2.1.- Fijación de nitrógeno

La biodisponibilidad de nitrógeno combinado en las tierras de cultivo es el principal factor limitante, después del agua, para el crecimiento vegetal. Debido a ello, resulta de gran interés para la mejora de la producción agrícola el estudio de la asociación entre bacterias diazotrofas, capaces de fijar nitrógeno atmosférico, y las plantas hospedadoras (Franché *et al.*, 2009).

El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015) reveló la presencia, en la isla genómica III, de los *clusters nif* y *rnfl*, en los cuales presumiblemente se encuentran los genes implicados en la síntesis y acoplamiento de la nitrogenasa, así como las proteínas accesorias necesarias para la transferencia de electrones que se produce durante el proceso de fijación de nitrógeno, sugiriendo la posibilidad de que *Azoarcus* sp. CIB sea capaz de fijar nitrógeno. Para confirmar experimentalmente dicha capacidad, se creció anaeróbicamente *Azoarcus* sp. CIB en un medio mínimo libre de fuente de nitrógeno (medio MNF). El hecho de que la cepa CIB fuera capaz de crecer en dicho medio indicaba su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. A continuación, se cuantificó la fijación de N₂ por *Azoarcus* sp. CIB mediante el método de reducción de acetileno (ver apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos). Como se indica en la tabla 7, la actividad nitrogenasa de las células crecidas en medio MNF fue un orden de magnitud superior a la de aquellas crecidas en el mismo medio suplementado con cloruro amónico como fuente de nitrógeno, confirmándose que la cepa CIB poseía una enzima nitrogenasa funcional.

Resultados

Tabla 7. Determinación de la actividad nitrogenasa en *Azoarcus* sp. CIB.

Medio	24 h		48 h	
	$\mu\text{mol/cultivo}$ ($A_{600} = 0,4$)	$\mu\text{mol/g cultivo fresco}$	$\mu\text{mol/cultivo}$ ($A_{600} = 0,4$)	$\mu\text{mol/g cultivo fresco}$
-N	$1,37 \pm 0,4$	$13,69 \pm 2,1$	$2,41 \pm 0,3$	$24,03 \pm 4,7$
+N	$0,34 \pm 0,07$	$1,51 \pm 0,4$	$0,26 \pm 0,09$	$1,68 \pm 0,55$

Las células se crecieron en medio MNF suplementado con 0,37 g/l de NH_4Cl (+N) o sin ninguna fuente de nitrógeno (-N). Los resultados se muestran como valores totales (μmol de C_2H_4 formado a partir de 30 ml de un cultivo recogido a una A_{600} de 0,4) y específicos (μmol de C_2H_4 por gramo de peso fresco bacteriano). Los valores son la media de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

2.2.- Solubilización de fosfato inorgánico

El fosfato, en sus formas solubles, es un nutriente limitante en los suelos de la mayoría de las tierras cultivables. Por ello, la habilidad de algunas bacterias asociadas a planta para movilizarlo, transformando sus formas insolubles en solubles, presenta un gran interés para la mejora del crecimiento de las plantas al permitir a éstas su acceso a este nutriente (Nosrati *et al.*, 2014).

Para comprobar si *Azoarcus* sp. CIB es capaz de solubilizar fosfatos se creció la bacteria aeróbicamente en placas de medio MALP preparado con fosfato cálcico como principal fuente de fosfato (ver apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos). Tras 14 días de incubación a 30°C, las colonias de *Azoarcus* sp. CIB mostraron un halo a su alrededor debido a la solubilización del fosfato cálcico circundante (Fig. 19). Este resultado indicó que *Azoarcus* sp. CIB es capaz de solubilizar y usar fosfato cálcico como fuente de fósforo.

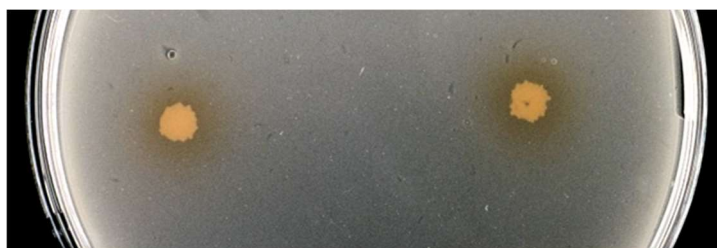


Figura 19. Halo de solubilización formado por *Azoarcus* sp. CIB creciendo en medio mínimo con fosfato cálcico como única fuente de fósforo. Las bacterias se crecieron en medio MALP y tras su incubación durante 14 días a 30°C se observó el halo característico de solubilización del fosfato del medio alrededor de las colonias.

2.3.- Producción de ácido indolacético (IAA)

El IAA es un tipo de auxina natural implicada en la regulación del desarrollo de la planta a varios niveles, y cuya síntesis como metabolito secundario por parte de ciertas bacterias está ampliamente distribuida entre aquéllas capaces de interactuar con la planta (Park *et al.*, 2017).

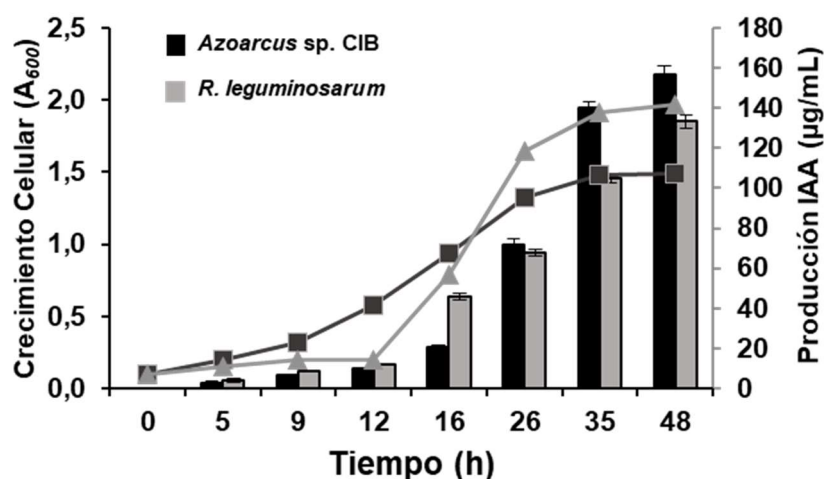


Figura 20. Producción de IAA a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Rhizobium leguminosarum* v. *trifolii* TT-7C. Se midió el crecimiento, representado como incremento de la A_{600} , de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (cuadrados) y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TT-7C (triángulos) en medio MC suplementado con 2,5 mM de triptófano. En el gráfico de barras se muestra la producción de IAA ($\mu\text{g/mL}$), cuantificada con el reactivo de Salkowski (ver apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos) a lo largo de la curva de crecimiento para *Azoarcus* sp. CIB (negro) y *R. leguminosarum* v. *trifolii* TT-7C (gris).

Para analizar la capacidad de síntesis de IAA, se crecieron células de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC suplementado con 2,5 mM de triptófano, un precursor de la síntesis de IAA. Como control positivo se utilizó una cepa productora de IAA, la bacteria *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TT-7C (Yanni A *et al.*, 2001). A continuación, se cuantificó la cantidad de IAA sintetizado a lo largo de la curva de crecimiento utilizando el método colorimétrico basado en el reactivo de Salkowski (Salkowski, 1885) (ver apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos). El ensayo colorimétrico mostró que *Azoarcus* sp. CIB es una cepa capaz de producir IAA, con valores incluso superiores a la cepa productora *R. leguminosarum* (Fig. 20). Por el contrario, la reacción colorimétrica fue negativa para otra bacteria endófito, *A. communis* (datos no mostrados), indicando que la capacidad de síntesis de IAA no está necesariamente ligada al estilo de vida endófito. Además, se pudo observar que la producción de IAA en *Azoarcus* sp. CIB es dependiente

de fase, viéndose incrementada al final de la fase exponencial con una producción máxima tras 48 horas de cultivo (Fig. 20), tal y como previamente se había descrito en otras bacterias productoras de auxinas (Patten y Glick, 2002; Spaepen y Vanderleyden, 2011).

2.4.- *Azoarcus* sp. CIB no es un patógeno de plantas

Resultados previos han mostrado que las bacterias del género *Azoarcus* analizadas hasta la fecha no muestran efectos patogénicos sobre plantas (Hurek *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006). Para comprobar que la cepa CIB tampoco es patógena, se realizó una prueba estandarizada que analiza el potencial patogénico de un microorganismo empleando el tabaco como planta modelo para la infección (Klement, 1963). Para ello se inocularon de forma independiente células de *Azoarcus* sp. CIB y de la bacteria patógena *P. syringae* pv. *syringae* en hojas de tabaco. Mientras que las plantas inoculadas con *P. syringae* mostraron, en tan sólo dos días, necrosis en sus hojas debido a la respuesta de hipersensibilidad que la planta desarrolla como defensa frente a este patógeno, la inoculación con *Azoarcus* sp. CIB no provocó ninguna respuesta visible pese al continuarse el experimento durante 10 días (Fig. 21). Estos resultados sugieren, por lo tanto, que *Azoarcus* sp. CIB no muestra un efecto patogénico sobre las plantas.

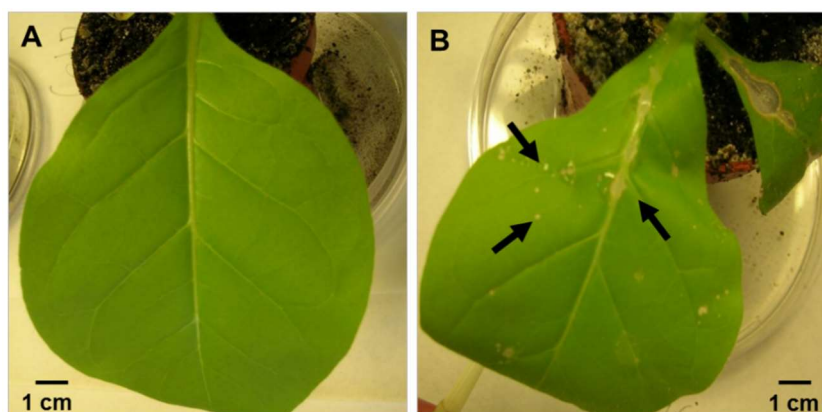


Figura 21. Test de patogenicidad sobre hojas de tabaco. Se inyectaron cultivos bacterianos en el interior de las hojas de tabaco para comprobar si la planta desarrollaba una respuesta de hipersensibilidad debido al potencial patogénico de las cepas. Al cabo de dos días se observaron signos de necrosis (flechas) en las plantas inoculadas con *P. syringae* pv. *syringae* (B) mientras que no se vieron efectos negativos en el desarrollo de las hojas en las plantas inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB (A) monitorizadas al cabo de 10 días.

2.5.- Efecto de la inoculación de *Azoarcus* sp. CIB en plantas de arroz

Tras demostrarse las propiedades PGP presentes en *Azoarcus* sp. CIB y su capacidad de vivir como endófito en el interior de las raíces de arroz, se procedió a estudiar si estas características se traducían en una mejora del crecimiento en las plantas inoculadas con la cepa CIB frente a las no inoculadas. Para ello se germinaron semillas de arroz y posteriormente se inocularon las plántulas con: (i) *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237), (ii) *E. coli* CC118 (pSEVA237), cepa no endófito de arroz utilizada como control para analizar la posible variación del crecimiento de la planta debido a la biomasa bacteriana, (iii) control de plántulas no inoculadas con bacterias. Las plántulas fueron incubadas a 25 °C en cámara de cultivo con fotoperiodo natural y, a los 5 días, 20 plántulas de cada condición se transfirieron a una cámara de cultivo con las siguientes características: fotoperiodo de 18 horas de luz y 8 horas de oscuridad; temperatura regulada a 25°C durante el día y 22°C durante la noche, y una humedad del 75% por el día y del 80% por la noche. En estas condiciones se mantuvieron durante 4 semanas, con riego cada 3 días utilizando medio Hoagland's para evitar la desecación del sustrato y re-inoculando una vez por semana con cultivos bacterianos a una A_{600} de 0,6 en medio Hoagland's. Transcurridas 4 semanas se recolectaron las plantas y se analizó su peso fresco, la longitud de la raíz y la longitud del tallo de cada una de ellas (Fig. 22).

Los resultados de la inoculación de plántulas de arroz muestran que la cepa CIB tiene un efecto positivo sobre la generación de biomasa vegetal (0,386 g) respecto a las plantas sin inocular (0,277 g) o a las inoculadas con *E. coli* (0,297 g) (Fig. 22A). No obstante, este efecto promotor del crecimiento vegetal, en torno a un 30% en términos de biomasa total, no se traduce en una mayor longitud de las raíces (Fig. 22B), y solo en un ligero incremento en la longitud del tallo de las plantas inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 22C).

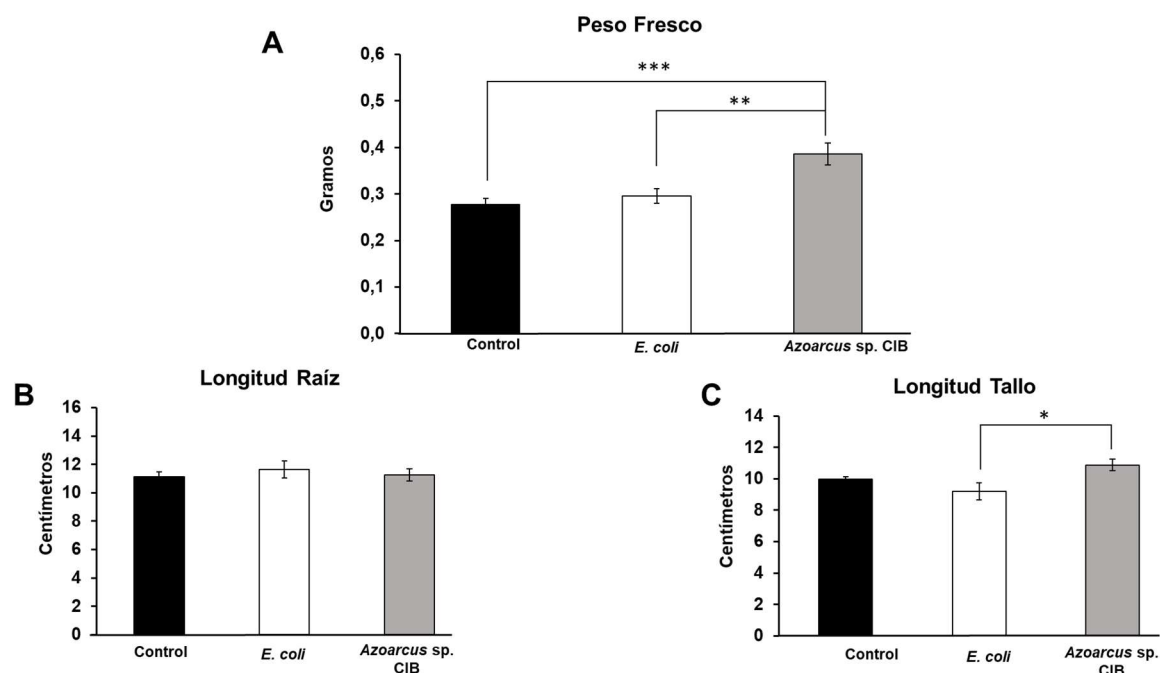


Figura 22. Análisis de la capacidad de *Azoarcus sp. CIB* para promover el crecimiento de plantas de arroz. Las plántulas de arroz sin inocular (Control), inoculadas con *E. coli* CC118 (pSEVA237) (*E. coli*) o inoculadas con *Azoarcus sp. CIB* (pSEVA237) (*Azoarcus sp. CIB*), se crecieron durante 4 semanas en cámaras de cultivo bajo condiciones controladas. **A)** Peso fresco total. **B)** Longitud de la raíz (desde el meristemo apical de la raíz hasta el cuello radicular). **C)** Longitud de la parte aérea (desde el cuello radicular hasta el meristemo apical del tallo). En las gráficas se muestran los valores medios de 20 plantas \pm error estándar. Los asteriscos muestran la significancia de las diferencias observadas al comparar dos situaciones y aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni. $P < 0,001$ (***); $P < 0,01$ (**); $P < 0,05$ (*).

3.- Implementación de una nueva propiedad PGP en *Azoarcus sp. CIB*

Dado que en los experimentos previos de inoculación con *Azoarcus sp. CIB* se observó un aumento de la producción de biomasa, sin que se vieran modificados otros parámetros de crecimiento del arroz, y con el objetivo de profundizar en el estudio de cómo las propiedades PGP afectan a la interacción con planta, se decidió implementar el potencial PGP de la cepa CIB mediante la introducción de alguna nueva propiedad. Una propiedad PGP ampliamente extendida en bacterias que interaccionan con plantas y que promueve el crecimiento de estas últimas es la actividad ACC desaminasa que, como se ha detallado en el apartado 2.3.1 de la Introducción, está relacionada con la reducción

de los niveles de estrés mediados por etileno y que, hasta la fecha, no se ha descrito en ninguna bacteria del género *Azoarcus* (Mitter *et al.*, 2013; Faoro *et al.*, 2017).

3.1.- Clonación y expresión del gen *acdS* en *Azoarcus* sp. CIB

Para obtener una cepa de *Azoarcus* sp. CIB con actividad ACC desaminasa, se clonó en primer lugar el gen *acdS* (codifica la enzima ACC desaminasa) de *B. phytofirmans* PsJN en el plásmido pIZ1016, bajo control del promotor *Ptac*, obteniéndose el plásmido pIZ*acdS* (Tabla 5), tal y como se detalla en el capítulo 3.7 de Materiales y Métodos. A continuación, se subclonó la fusión *Ptac:acdS* en el plásmido pSEVA237, generándose así el plásmido pSEVA237*acdS* (Tabla 5) que fue posteriormente transferido a *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación.

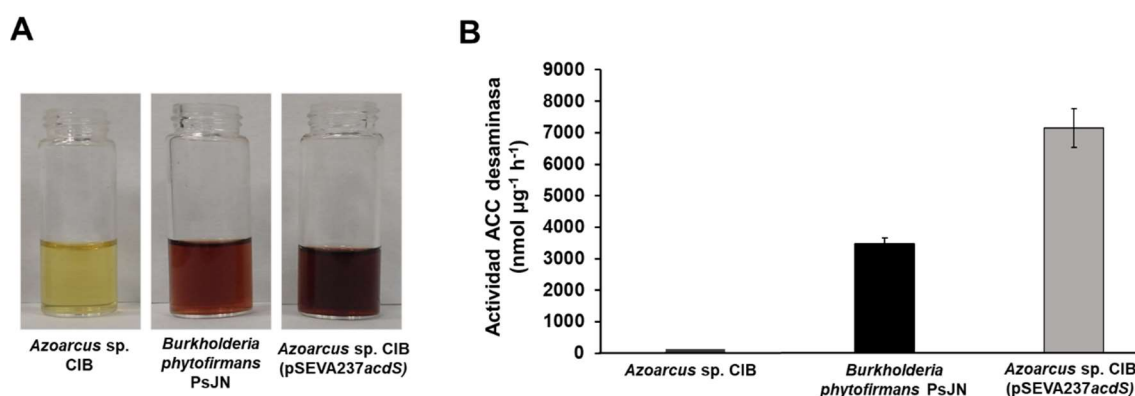


Figura 23. Actividad ACC desaminasa en diferentes bacterias. Se realizaron los ensayos de actividad ACC desaminasa según los protocolos detallados en el apartado 6.2.2 de Materiales y Métodos. **A)** Ensayo colorimétrico de actividad ACC desaminasa en la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB (izquierda), en la bacteria con actividad ACC desaminasa *B. phytofirmans* PsJN (centro) y en la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) (derecha). El revelado de la reacción progresa en intensidad desde amarillo (negativo) a marrón oscuro (positivo). **B)** Ensayo espectrofotométrico de la enzima ACC desaminasa durante la conversión del sustrato ACC en los productos NH_4 y α -cetobutirato (nmol α -cetobutirato μg proteína total $^{-1} \text{h}^{-1}$) en las tres cepas estudiadas. Los valores son la media de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Para confirmar que la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) posea actividad ACC desaminasa se realizó un ensayo enzimático siguiendo el protocolo previamente descrito (Penrose y Glick, 2003) y detallado en el apartado 6.2.2 de Materiales y Métodos. Los resultados del ensayo mostraron que, efectivamente, la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB no presenta actividad ACC desaminasa

mientras que la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) posee una elevada actividad enzimática ($6.716 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), duplicando los valores obtenidos con *B. phytofirmans* PsJN ($3.716 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Fig. 23). Cabe destacar que el hecho de que la cepa recombinante posea mayor actividad ACC desaminasa que la cepa original *B. phytofirmans* PsJN podría ser debido a que el gen *acdS* se localiza en un plásmido multicopia y bajo expresión constitutiva del promotor *P_{tac}* en la cepa recombinante.

3.2.- Efecto de la inoculación de la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) en plantas de arroz

Para determinar si la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) con actividad ACC desaminasa mostraba una mayor capacidad PGP que la cepa silvestre, se decidió inocular ambas cepas en arroz cultivado en condiciones de estrés que promuevan un incremento de la síntesis de etileno en la planta. La condición de estrés seleccionada fue el crecimiento del arroz en presencia de concentraciones subletales de cadmio, un elemento no esencial cuya acumulación en tierras contaminadas afecta de forma significativa a la producción agrícola debido al estrés severo que provoca sobre la planta. La respuesta de las plantas a metales pesados se ha asociado con la generación de ROS y con un aumento de los niveles de etileno (Keunen *et al.*, 2016), siendo el cadmio uno de los compuestos inorgánicos con mayor efecto fitotóxico y con mayor capacidad de inducción de la síntesis de etileno (Arteca y Arteca, 2007). Por otro lado, *Azoarcus* sp. CIB es resistente a concentraciones relativamente altas de cadmio (1,5 mM), en contraste con las plántulas de arroz para las cuales el cadmio resultó letal a una concentración de 500 μM .

Para la consecución del experimento se germinaron semillas de arroz, tras su desinfección superficial, y se inocularon, de forma independiente, con la cepa control *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y la cepa productora de ACC desaminasa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) tal y como se detalla en el apartado 6.3.4 de Materiales y Métodos. A las 24 h horas de la inoculación, las plántulas se transfirieron a tubos de ensayo con medio Hoagland's semisólido (0,4% agar) y tres concentraciones de cadmio: 0 (Control), 20 μM y 50 μM . Las plántulas se

cultivaron durante dos semanas en condiciones de invernadero. Transcurrido este tiempo se recolectaron y se midió el peso fresco y la longitud de las plantas (Tabla 8).

Tabla8. Peso y longitud de plantas de arroz crecidas en medio Hoagland's con cadmio.

Condición	Peso Fresco (mg)	Longitud (cm)
Control		
Sin inocular	393 ± 37	11,2 ± 0,37
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237)	402 ± 45	11,54 ± 1
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237 <i>acdS</i>)	377 ± 41	11,59 ± 0,47
Cadmio 20µM		
Sin inocular	230 ± 28	7,8 ± 0,29
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237)	245 ± 19	8,74 ± 0,55
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237 <i>acdS</i>)	235 ± 20	9,14 ± 0,34
Cadmio 50µM		
Sin inocular	166 ± 15**	6,72 ± 0,3*
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237)	173 ± 11**	7,72 ± 0,24
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pSEVA237 <i>acdS</i>)	202 ± 28	8,2 ± 0,45

n= 10 plantas ± desviación estándar. Los asteriscos muestran la significancia de las diferencias observadas respecto a la cepa con actividad ACC desaminasa, al aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni $P < 0,01$ (**); $P < 0,05$ (*).

Los resultados presentados en la tabla 8 muestran una tendencia al aumento del crecimiento y, más acusadamente, de la biomasa en las plantas de arroz sometidas a una condición de estrés severo (Cd 50 µM) cuando son inoculadas con la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) frente a cuando se inoculan con la cepa control o frente al control sin inocular. En la figura 24 se observa claramente el efecto pernicioso sobre el crecimiento del arroz cuando se incrementa la concentración de cadmio en el sustrato de crecimiento. Sin embargo, a la concentración más alta de cadmio testada, 50 µM, la inoculación con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) tiene un efecto promotor del crecimiento del arroz respecto a la no inoculación o a la inoculación con la cepa sin actividad ACC desaminasa.

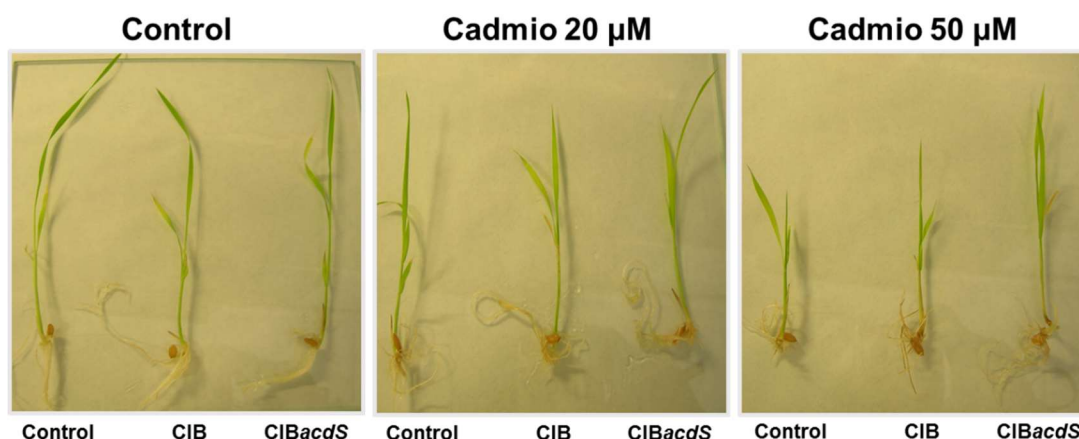


Figura 24. Efecto del cadmio sobre el crecimiento de plántulas de arroz inoculadas con cepas de *Azoarcus* sp. CIB. El arroz se cultivó en medio Hoagland's o medio Hoagland's suplementado con 20 µM de Cd o 50 µM de Cd. Las plantas fueron germinadas e inoculadas según se detalla en 6.3.4 Materiales y métodos y se cultivaron durante 15 días en condiciones de invernadero. En las imágenes se muestra una planta de cada condición en el momento de su recolección.

Como se ha comentado anteriormente, la respuesta de la planta ante el estrés producido por metales pesados está muy relacionada con la formación de ROS y el aumento de los niveles de etileno (Keunen *et al.*, 2016). Con el objetivo de conocer si la inoculación con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) o con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237acdS) afectaba de forma diferencial a los niveles de ROS del arroz, se midió la actividad de la enzima SOD, una enzima ligada con la respuesta al estrés oxidativo producido por el metal en la planta, en muestras de raíz siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.3 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en ausencia de inoculación bacteriana indican que, como era previsible, la actividad de la enzima superóxido dismutasa del arroz se ve incrementada en presencia de cadmio (hasta un 66% en presencia de 50 µM de Cd) (Fig. 25). Sin embargo, la respuesta de las plantas a este estrés se ve modificada al inocularlas con las cepas de *Azoarcus*. Así, la tendencia indica que la actividad SOD disminuye en las plantas inoculadas respecto al control sin inocular, siendo especialmente destacable esta disminución cuando se inoculan con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237acdS).

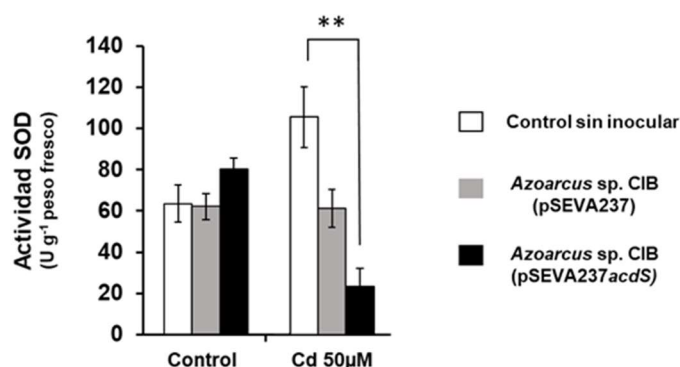


Figura 25. Medida de la actividad de la enzima SOD en raíz de arroz. Las muestras de plantas cultivadas en medio Hoagland's con presencia/ausencia de cadmio y bacterias se recolectaron y se valoró la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) según se indica en el apartado 6.2.3 de Materiales y Métodos. Los datos representados son la media \pm desviación estándar de 10 muestras. Los asteriscos muestran la significancia al aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni. $P < 0,01$ (**); $P < 0,05$ (*).

Estos resultados sugieren que la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237acdS) con actividad ACC desaminasa modula los niveles de etileno que se produce en la planta, provocando una mejora en el crecimiento del arroz en condiciones de estrés e influyendo en la respuesta defensiva de la planta que muy probablemente reduce la generación de ROS en presencia de cadmio.

4.- Implicación de la movilidad en el establecimiento del estilo de vida endófito en *Azoarcus* sp. CIB

En el apartado 2.2.1 de la Introducción se ha revisado el estado del conocimiento actual sobre los factores bacterianos relacionados con el establecimiento del estilo de vida endófito. Los estudios realizados en la bacteria modelo *Azoarcus* sp. BH72 han permitido concluir que tanto la movilidad como la adhesión son esenciales para una correcta interacción planta-bacteria (Böhm *et al.*, 2007; Buschart *et al.*, 2012). Con el objetivo de seguir profundizando en el estudio de estos mecanismos moleculares, se generaron cepas de *Azoarcus* sp. CIB mutantes en genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de los *pili* tipo IV o en la movilidad del flagelo. Estas cepas mutantes fueron caracterizadas fenotípicamente y se realizaron experimentos para estudiar su capacidad de colonización de raíces de arroz en comparación con la cepa silvestre.

4.1.- Implicación de los *pili* tipo IV en la interacción entre *Azoarcus* sp. CIB y el arroz

Como se ha indicado en el apartado 4.1 de la Introducción, *Azoarcus* sp. CIB posee varios *clusters* génicos (Tabla 2) presuntamente responsables de la síntesis de los *pili* tipo IV implicados en movilidad y adhesión bacteriana (Martín-Moldes *et al.*, 2015). Estudios previos realizados en *Azoarcus* sp. BH72 habían demostrado el papel de la pilina menor (PilX) en la adhesión, movilidad y colonización endofítica de esta cepa (Shidore *et al.*, 2012).

Con el objetivo de confirmar en *Azoarcus* sp. CIB la participación de PilX en la colonización de la raíz de arroz, se construyó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dpilX* que contiene una disrupción insercional del gen *pilX* (Tabla 4), tal y como se detalla en el apartado 5 de Materiales y Métodos. Para comprobar que la mutación se había realizado correctamente y analizar posibles efectos polares sobre el gen *pilY1* situado en posición 3' a *pilX* (Fig. 26A), se amplificaron mediante RT-PCR fragmentos de los genes *pilX* y *pilY1*. Como puede observarse en la figura 26B, mientras que en la cepa silvestre se detectó la expresión tanto del gen *pilX* como de *pilY1*, en *Azoarcus* sp. CIB*dpilX* no se pudieron detectar transcritos de ninguno de estos genes, confirmando así la inactivación del gen *pilX* y el efecto polar de la inserción en los genes localizados en posición 3' a dicha inserción.

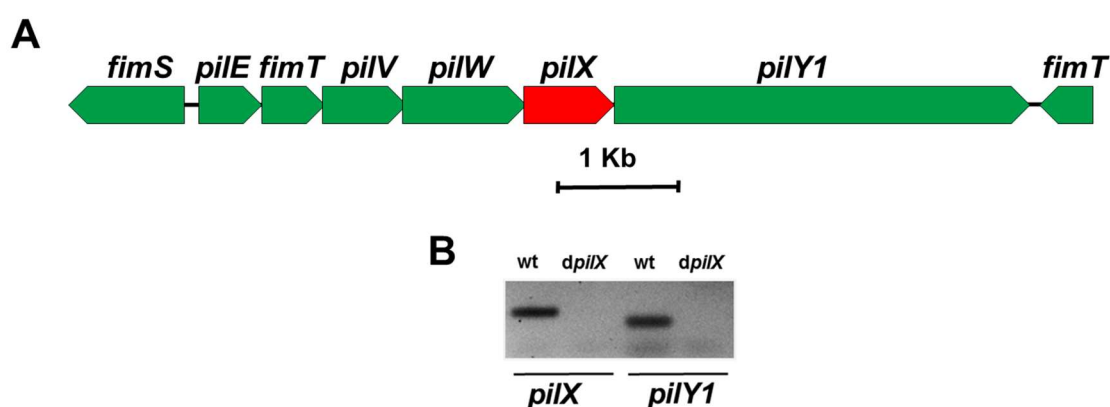


Figura 26. Organización y expresión de un *cluster* génico de biosíntesis de los *pili* tipo IV en *Azoarcus* sp. CIB. A) El gen *pilX* (rojo) presuntamente codifica una pilina menor de los *pili* tipo IV. Los genes y los espacios intergénicos se representan a escala. **B)** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR de los genes *pilX* y *pilY1* obtenidos a partir de RNA extraído de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (wt) y *Azoarcus* sp. CIB*dpilX* (*dpilX*) cultivadas en medio VM hasta una A_{600} de 0,6. La extracción del RNA y la técnica de RT-PCR se realizó siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos, utilizando para la amplificación de los fragmentos de los genes *pilX* y *pilY1* las parejas de oligonucleótidos 5'RT*pilX*/3'RT*pilX* y 5'RT*pilY1*/3'RT*pilY1*, respectivamente (Tabla 6).

Una vez confirmada la construcción de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dpilX*, se analizó su fenotipo de movilidad. A pesar de que el fenotipo de movilidad más estrechamente asociado a los *pili* tipo IV es el *twitching* (Mattick, 2002), no se observó este tipo de movilidad en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (datos no mostrados). Sin embargo, sí se consiguió observar *swarming* en *Azoarcus* sp. CIB, un tipo de movilidad en la cual están implicados tanto el flagelo como los *pili* tipo IV (Kaiser, 2007). En la Fig. 27A se puede observar que la cepa mutante ve reducido su patrón de *swarming* en un 40% respecto al de la cepa silvestre, lo que está de acuerdo con el fenotipo esperado para un mutante en los genes *pil*, y sugiere que dichos genes codifican realmente un aparato de movilidad en *Azoarcus* sp. CIB.

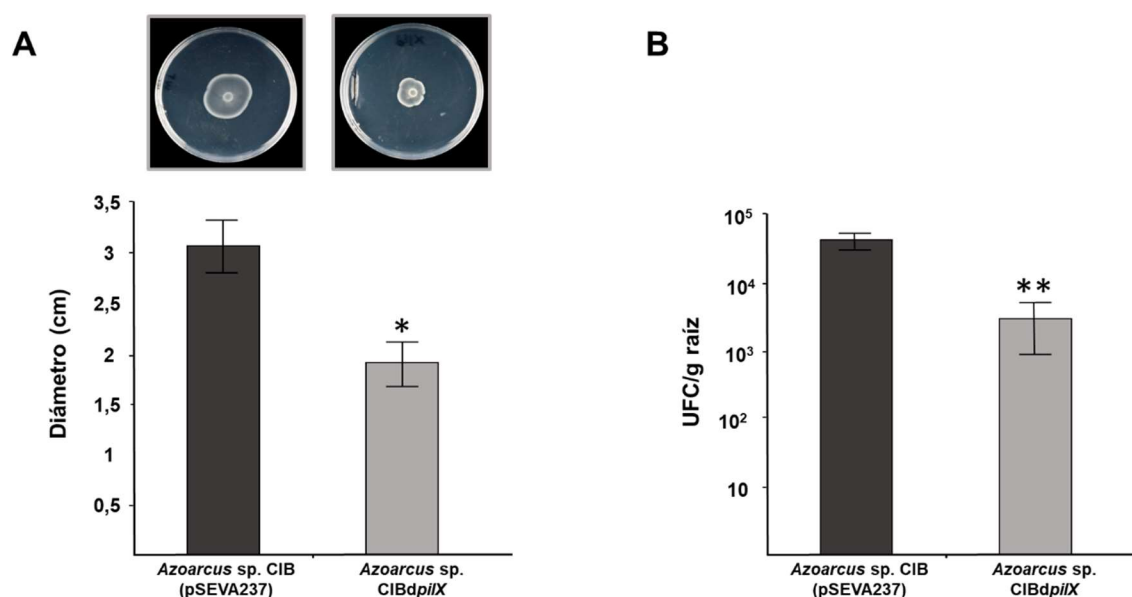


Figura 27. Fenotipos de movilidad y colonización de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dpilX*. **A)** Movilidad de tipo *swarming* (en medio MC 0,4% agar; ver apartado 6.1.3 de Materiales y Métodos) de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) (izquierda) y *Azoarcus* sp. CIB*dpilX* (derecha) y cuantificación del diámetro de los halos. N=3, la barra de error indica la desviación estándar. **B)** Cuantificación del número de endófitos extraídos de raíces de arroz tras la inoculación de plántulas de arroz con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y *Azoarcus* sp. CIB*dpilX*. Las bacterias se aislaron de plantas crecidas a 25°C en cámara de cultivo durante 5 días (ver sección 6.3 de Materiales y Métodos). En el gráfico se muestran los valores de UFC por gramo de raíz (peso fresco) de tres experimentos independientes, mostrándose en la gráfica la desviación estándar. Los asteriscos muestran la significancia de las diferencias observadas al comparar las cepas y aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni P<0,01 (**); P<0,05 (*).

Resultados

Posteriormente, se analizó la capacidad colonizadora de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dpilX* sobre plántulas de arroz. En los ensayos de colonización realizados sobre plántulas de arroz (Fig. 27B) se observó una disminución de más de un orden de magnitud en el número de endófitos reaislados por gramo de raíz en las plántulas inoculadas con la cepa mutante (una media de $3,18 \times 10^3$ bacterias) respecto a plántulas inoculadas con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) ($4,57 \times 10^4$ bacterias). Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que los *pili* tipo IV están implicados en la interacción de la cepa CIB con la planta de arroz.

4.2.- El flagelo de *Azoarcus* sp. CIB es necesario para la colonización

Estudios previos han sugerido la necesidad de la presencia de un flagelo funcional para el establecimiento inicial de la interacción planta-bacteria y para la elección del mejor nicho dentro del hospedador, de modo que bacterias endófitas deficientes en flagelo ven mermada su capacidad colonizadora (Buschart *et al.*, 2012)

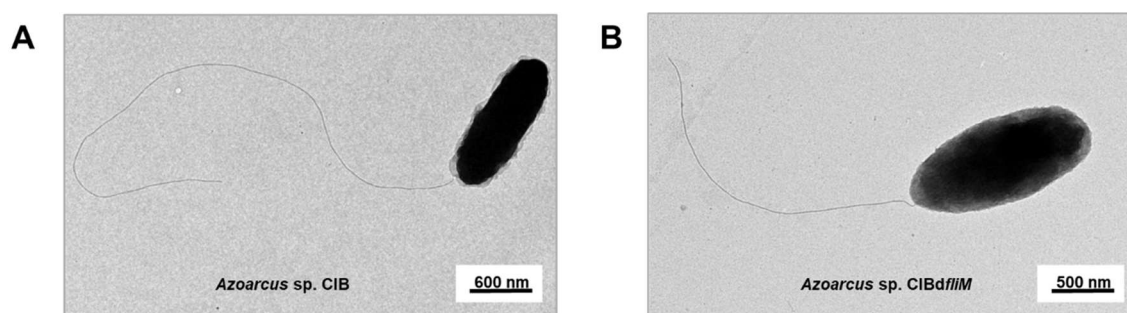


Figura 28. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dfliM*. Imágenes de TEM, obtenidas mediante tinción con ácido fosfotúngstico para facilitar la visualización del flagelo, de células de *Azoarcus* sp. CIB (A) y *Azoarcus* sp. CIB*dfliM* (B).

Azoarcus sp. CIB posee, al menos, un flagelo polar que se puede observar mediante tinción en microscopía electrónica de transmisión (Fig. 28A). La síntesis y regulación del flagelo está codificada en tres *clusters* génicos que se localizan en distintas regiones del genoma de la cepa CIB (Tabla 2) (Martín-Moldes *et al.*, 2015). Con el objetivo de demostrar si la funcionalidad del flagelo es determinante para el establecimiento de la cepa CIB dentro de la raíz de arroz, se realizó una

mutación polar en el *cluster fli* que contiene los genes responsables del motor del flagelo. Para ello, se realizó una mutación insercional del gen *fliM* (Fig. 29A) obteniéndose la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBd*fliM* (Tabla 4) según el protocolo descrito en el apartado 5 de Materiales y Métodos. Posteriormente, se confirmó mediante RT-PCR la correcta inserción y sus efectos polares en el *cluster fli* de la cepa *Azoarcus* sp. CIBd*fliM* (Fig. 29B).

A pesar de que la mutación del gen *fliM* no conlleva la pérdida estructural del flagelo polar (Fig. 28B), la realización de ensayos de movilidad de tipo *swimming*, movimiento bacteriano asociado a flagelos (Kearns, 2010), demostraron que la cepa mutante ve mermada su capacidad de movimiento en torno a un 50% respecto a la cepa parental (Fig. 30A), lo que sugiere una importante pérdida de funcionalidad del flagelo, como cabría esperar al inactivarse el motor flagelar.

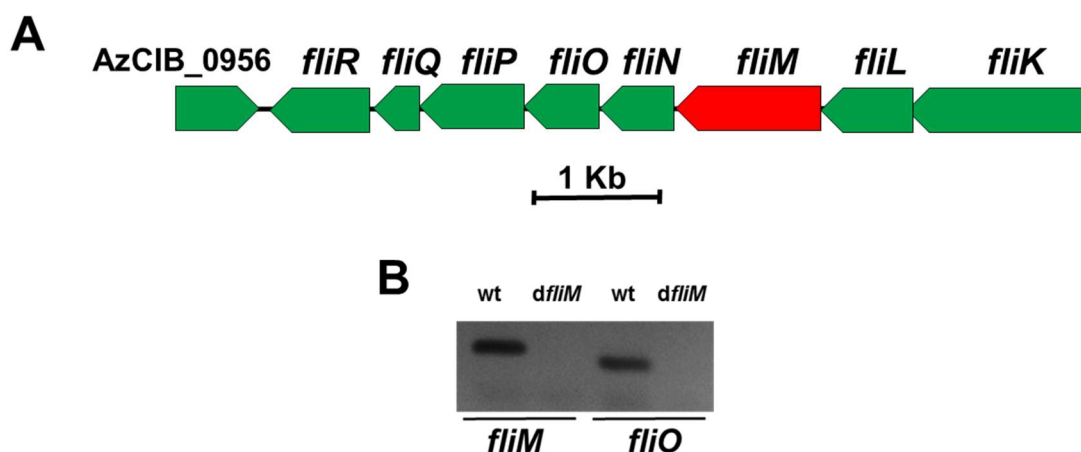


Figura 29. Organización génica y expresión del cluster de biosíntesis del motor flagelar en *Azoarcus* sp. CIB. A) El gen *fliM* (rojo) codifica una subunidad estructural del motor del flagelo. Los genes se representan a escala. **B)** Electroforesis en gels de agarosa de los productos de RT-PCR de los genes *fliM* y *fliO* obtenidos a partir de RNA extraído de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (wt) y *Azoarcus* sp. CIB *dfliM* (*dfliM*) cultivadas en medio VM hasta una A_{600} de 0,6. La extracción del RNA y la técnica de RT-PCR se realizó siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos, utilizando para la amplificación de los fragmentos de los genes *fliM* y *fliO* las parejas de oligonucleótidos 5'RT*fliM*/3'RT*fliM* y 5'RT*fliO*/3'RT*fliO*, respectivamente (Tabla 6).

Una vez caracterizado el fenotipo de la cepa *Azoarcus* sp. CIBd*fliM*, se realizó un ensayo de colonización de plántulas de arroz (apartado 6.3 de Materiales y métodos). El resultado obtenido (Fig. 30B), reveló que el número de

Resultados

endófitos tras la inoculación con la cepa mutante fue en torno a un orden de magnitud inferior ($3,43 \times 10^3$ bacterias) al número de endófitos extraídos tras la inoculación con la cepa silvestre ($4,57 \times 10^4$ bacterias). Estos resultados confirman un papel importante del flagelo en algún estadio de la colonización endofítica del arroz por *Azoarcus* sp. CIB, y revelan por primera vez que la mera presencia del flagelo no es suficiente, sino que éste debe ser plenamente funcional para facilitar la interacción con la planta.

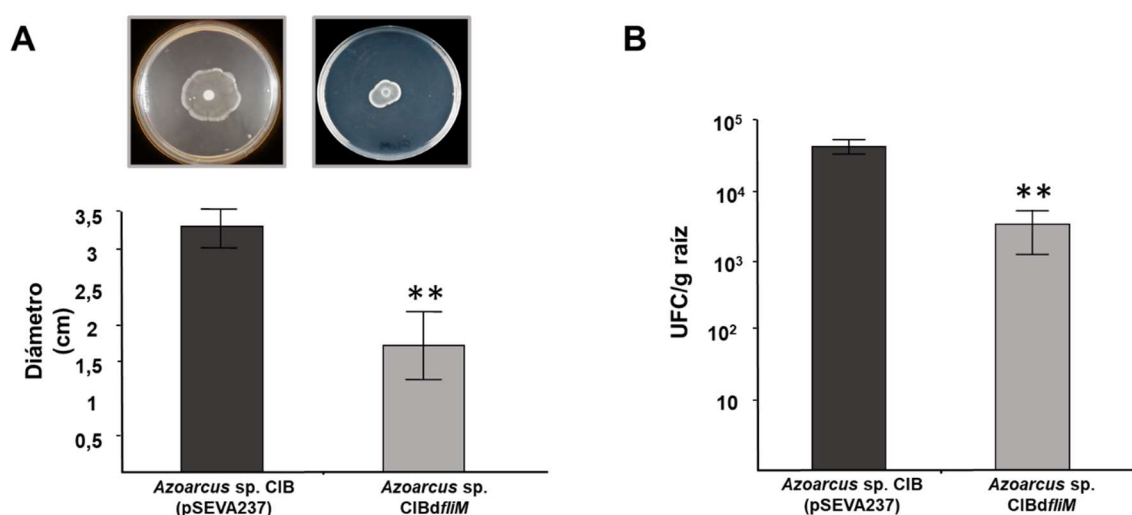


Figura 30. Fenotipos de movilidad y capacidad de colonización de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdfliM. **A)** Movilidad de tipo *swimming* en placa de agar semisólido (ver sección 6.1.3 de Materiales y métodos) de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y *Azoarcus* sp. CIBdfliM, y cuantificación del diámetro de los halos. **B)** Cuantificación del número de endófitos extraídos de raíces de arroz tras la inoculación con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y *Azoarcus* sp. CIBdfliM. Las plántulas se crecieron a 25°C en cámara de cultivo durante 5 días siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos. En el gráfico se muestran los valores de UFC por gramo de raíz (peso fresco) de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Los asteriscos muestran la significancia de las diferencias observadas al comparar las cepas y aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni $P < 0,01$ (**).

5.- Estudios de expresión génica global de *Azoarcus* sp. CIB en presencia de extractos de raíz de arroz

Como se ha indicado en la Introducción, se desconocen todavía muchos de los mecanismos moleculares implicados en la comunicación planta-bacteria y en la adaptación de la bacteria al ambiente de la endosfera. En los últimos años se

ha realizado un gran esfuerzo para dar respuesta a estos interrogantes mediante análisis ómicos de bacterias que interaccionan con plantas. Debido a la dificultad que representa el aislamiento de una cantidad suficiente de RNA de organismos endófitos no formadores de nódulos, en la mayoría de los casos se han abordado aproximaciones experimentales que permitan estudios de expresión génica global cuando las bacterias se cultivan en medios que contengan señales que mimeticen a las de la endosfera de las plantas. Por ejemplo, para el estudio de la interacción entre endófitos y hospedadores se han utilizado exudados de arroz para el análisis transcriptómico de *Azoarcus* sp. BH72 (Shidore *et al.*, 2012), se ha comparado el transcriptoma de *Enterobacter* sp. 638 cultivado en sacarosa, fuente de carbono asociada a la interacción con planta, con el transcriptoma de la bacteria cultivada en lactato (Taghavi *et al.*, 2015), o se ha estudiado el proteoma de la bacteria endófito *H. seropedicae* en respuesta a extractos de caña de azúcar (Cordeiro *et al.*, 2013).

Con el objetivo de tratar de identificar posibles mecanismos moleculares nuevos implicados en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB al modo de vida endófito, se realizó un abordaje transcriptómico de la bacteria creciendo en presencia de extractos de raíz de arroz.

5.1.- Extracción del RNA y secuenciación del cDNA.

Para la extracción del RNA total se creció un cultivo de *Azoarcus* sp. CIB en medio VM hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (A_{600} 0,6). De acuerdo a como se detalla en el apartado 6.4.1 de Materiales y Métodos, las células se recogieron por centrifugación y, tras un lavado con solución salina isotónica (0,85%), se dividieron en las dos condiciones de ensayo: (i) condición control en solución salina (C_n) y (ii) presencia de extractos de arroz (E_n). Al cabo de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en condiciones suaves de agitación (50 rpm) se recogieron las células por centrifugación para la extracción del RNA total y el análisis de su integridad, realizándose tres réplicas biológicas para cada condición.

Las muestras de RNA total, 10 μ g por muestra, fueron procesadas para la construcción de las librerías de cDNA y su posterior secuenciación masiva

Resultados

mediante tecnología *Illumina*® tal y como se detalla en el apartado 6.4.2. de Materiales y Métodos. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB (Tabla 9).

Tabla 9. Estadísticas del alineamiento con el genoma de *Azoarcus* sp. CIB de las lecturas obtenidas mediante RNA-seq de las muestras correspondientes a las condiciones control (C₁₋₃) y presencia de extractos de raíz de arroz (E₁₋₃).

Muestra	Nº de Lecturas totales	Mapeadas en genoma	Lecturas únicas	Lecturas múltiples
C ₁	26.164.924	23.700.622 (90,58%)	23.227.699 (88,77%)	472.923 (1,81%)
C ₂	26.767.360	25.142.316 (93,93%)	24.660.663 (92,13%)	481.683 (1,8%)
C ₃	25.754.418	19.307.980 (74,97%)	18.975.682 (73,68%)	332.298 (1,29%)
E ₁	26.460.832	23.532.345 (88,93%)	23.061.223 (87,15%)	471.122 (1,78%)
E ₂	26.070.192	22.861.369 (87,69%)	21.179.564 (81,24%)	1.681.865 (6,45%)
E ₃	26.629.894	22.878.626 (85,91%)	22.092.386 (82,96%)	786.240 (2,95%)

La distribución de los alineamientos fue realizada con el método SOAPaligner/SOAP2.

5.2.- Análisis de los genes diferencialmente expresados en presencia de extractos de raíz de arroz

Para poder comparar los resultados obtenidos en cada muestra es necesaria una normalización de los datos teniendo en cuenta parámetros como la cantidad total de lecturas mapeadas y el tamaño del gen. Por ello, se normalizaron los valores obtenidos según el nivel de expresión de cada gen, definiendo el valor de RPKM (*Reads per Kb of transcript per million mapped reads*) y el FDR (*False Discovery Rate*) que nos indica la probabilidad de equivocarse en el análisis de expresión realizado. A partir de estos datos se calculó el *Fold Change*, es decir, la diferencia de expresión normalizada en RPKM entre las dos condiciones estudiadas, *i.e.*, perfil de expresión en presencia de extractos frente a la condición control.

Una primera aproximación a los niveles de expresión obtenidos para cada gen tras este primer análisis bioinformático de la transcriptómica se puede observar en un mapa de calor (Fig. 31). En él se representan, manteniendo el orden en el que aparecen anotados en el genoma, los 4.685 genes que presentan, en todas las condiciones analizadas, un valor de RPKM >0.

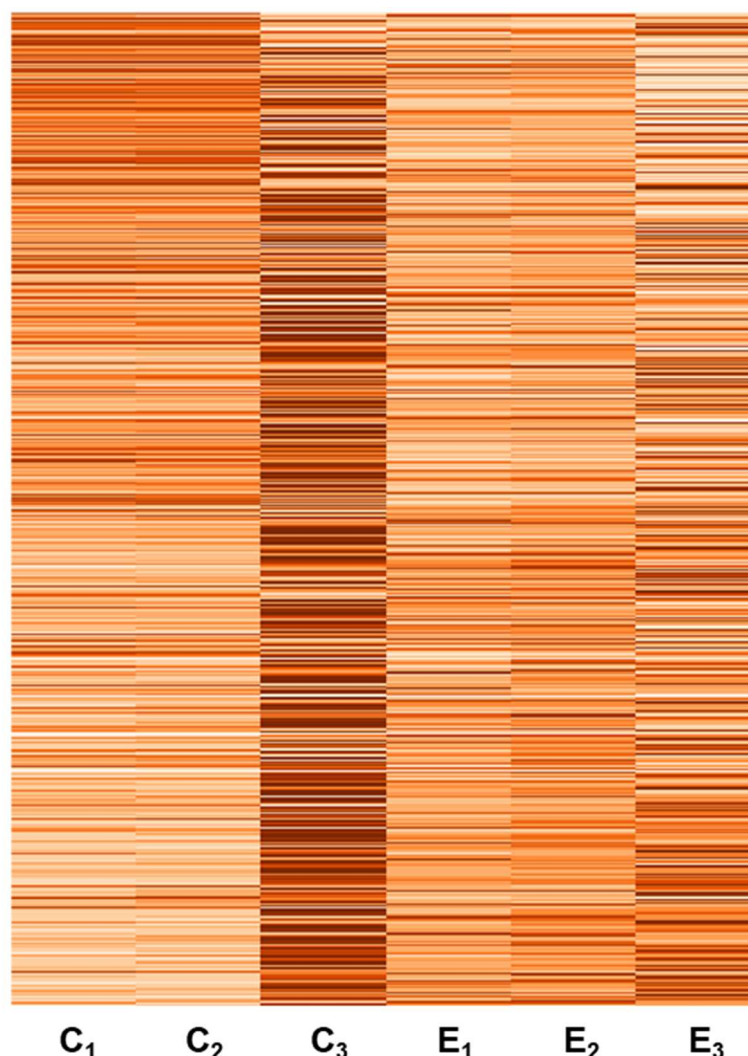


Figura 31. Representación global de los genes con RPKM>0 seleccionados del análisis transcriptómico comparativo entre las muestras obtenidas de condiciones control (C_n) y las obtenidas en presencia de extractos de planta (E_n). Los genes aparecen ordenados según la anotación del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, mostrándose su expresión desde el mínimo (blanco) al máximo (marrón) nivel.

Con los resultados obtenidos del análisis bioinformático se realizó una selección para obtener una lista de genes diferencialmente expresados, DEGs (*Differentially Expressed Genes*) entre la condición control y la condición en presencia de extractos de planta. El cribado para la obtención de estos DEGs se realizó tomando como significativos aquellos genes cuya expresión presentaba una variación (\log_2 del *Fold Change*) mayor o igual a 1 y un valor de FDR menor o igual a 0,001. Así, con estas restricciones, se obtuvieron un total de 1.382, 1.446 y 1.974 DEGs en cada una de las réplicas analizadas (Fig. 32), lo que supone, respectivamente, un 29,16%, 30,51% y 41,65% de los 4.739 genes codificantes de proteínas anotados en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB.

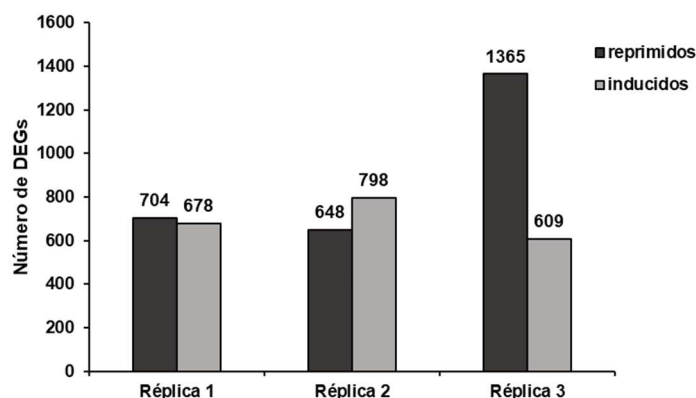


Figura 32. Distribución del número de DEGs reprimidos (negro) o inducidos (gris) en presencia de extractos de raíz de arroz en cada una de las tres réplicas experimentales. Son considerados DEGs aquellos genes cuyo \log_2 del *Fold Change* es ≥ 1 y su $FDR \leq 0.001$.

Debido a la variabilidad obtenida en el número de DEGs entre las diferentes muestras, se agruparon las tres réplicas biológicas hallando el valor medio de los RPKM obtenidos para cada gen aplicando el siguiente cribado para ser considerados DEGs comunes: (i) que presenten en todas las muestras una variación (\log_2 del *Fold Change*) mayor o igual a 1 y (ii) que su probabilidad aplicando el análisis estadístico NOIseq sea mayor o igual a 0,8 (Fig. 33). De este modo se obtuvieron finalmente 389 DEGs comunes a las tres réplicas, los cuales representan un 8,2% del total de genes de *Azoarcus* sp. CIB, con los que se prosiguió el análisis de la transcriptómica.

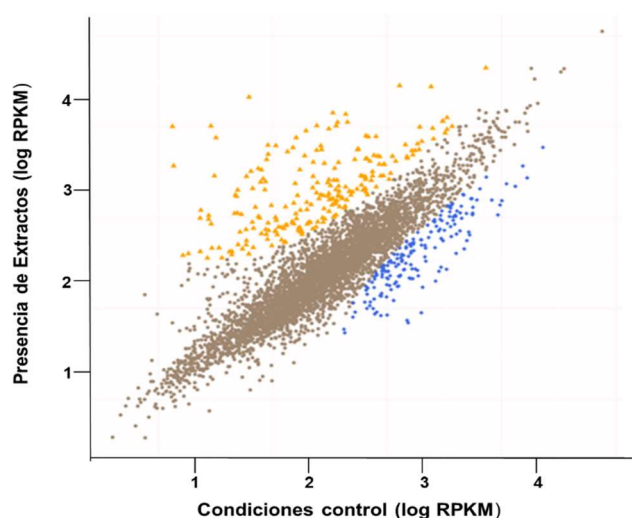


Figura 33. Gráfica de dispersión de los genes expresados al comparar la condición de cultivo control de *Azoarcus* sp. CIB frente al cultivo en presencia de extractos de raíz de arroz. Los datos se representan como el logaritmo decimal de las medias del valor de RPKM en las tres réplicas biológicas analizadas en condición control (abscisas) frente al logaritmo decimal de las medias del valor de RPKM de las tres réplicas biológicas analizadas en presencia de extractos de raíz de arroz (ordenadas). Cada punto representa un gen del genoma, representándose en gris los no DEGs, en amarillo los DEGs inducidos (218) y en azul los DEGs reprimidos (171).

Para analizar mejor las posibles funciones celulares que se ven modificadas en presencia de extracto de arroz y que, por tanto, podrían jugar un papel en la interacción planta-bacteria, se agruparon los DEGs en sus respectivas categorías de grupos de ortólogos, COG (*Clusters of Orthologous Groups*). Se han podido agrupar 343 de los 389 DEGs identificados en un total de 20 categorías COG (Fig. 34). Aunque la mayoría se anotaron en una categoría única, 34 DEGs se agruparon simultáneamente en 2 categorías COG y 9 DEGs se anotaron en 3 categorías COG diferentes.

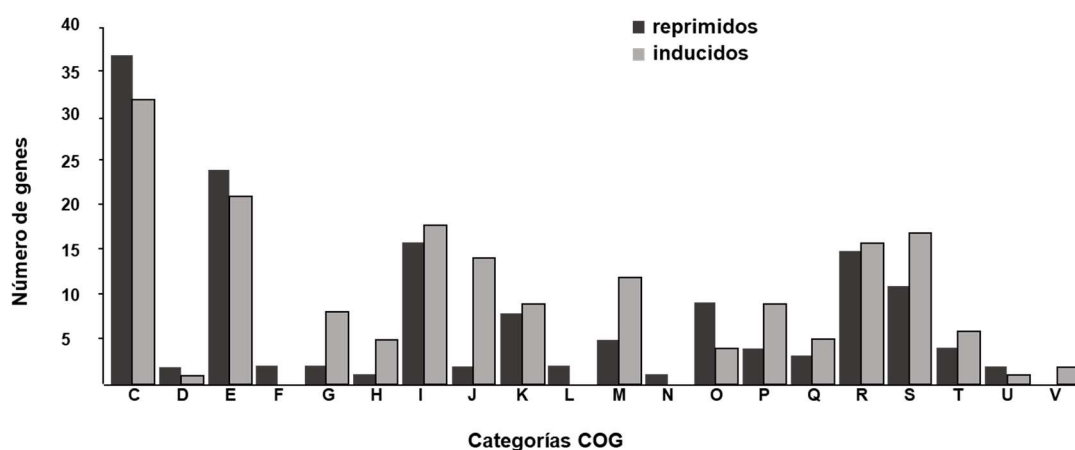


Figura 34. Distribución en categorías COG de los DEGs analizados en presencia de extractos de raíz de arroz según se encuentren reprimidos (barras negras) o inducidos (barras grises). En el eje de abscisas cada letra representa una categoría COG en la que se han clasificado los genes según sus funciones: C, producción y conversión de energía; D, control del ciclo celular y mitosis; E, metabolismo y transporte de aminoácidos; F, metabolismo y transporte de nucleótidos; G, metabolismo y transporte de carbohidratos; H, metabolismo de coenzimas; I, metabolismo de lípidos; J, traducción; K, transcripción; L, replicación y reparación; M, biogénesis de la membrana y la pared celular; N, movilidad celular; O, modificaciones postraduccionales, intercambio de proteínas y chaperonas; P, transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q, biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R, genes con función general; S, genes de función desconocida; T, mecanismos de transducción de señales; U, tráfico intracelular y secreción; V, mecanismos de defensa.

De acuerdo a la clasificación en categorías COG a la que se han asociado los DEGs, la presencia de extractos de arroz modifica, principalmente, la expresión de genes relacionados con la producción y conversión de energía (C) y con el metabolismo y transporte de aminoácidos (E) que representan en conjunto más del 30% del total de DEGs. Asimismo, se aprecia una tendencia a la inducción de genes asociados al metabolismo y transporte de carbohidratos (G), coenzimas (H) e iones inorgánicos (P), procesos de traducción (J) y biogénesis de membrana y

Resultados

pared celular (M). Por el contrario, se observó un mayor número de DEGs reprimidos en funciones relacionadas con la movilidad (N), replicación y reparación (L), y las modificaciones postraduccionales y chaperonas (O).

La lista de DEGs obtenidos para la media de las tres réplicas biológicas puede consultarse en la tabla S1, mostrándose para cada gen: (i) el número de identificación, (ii) la función asignada, (iii) la categoría COG, (iv) el número de veces que se ve inducido (rojo)/reprimido (verde), expresada esta variación como *Fold Change*, y (v) la probabilidad estadística de que este valor sea cierto al aplicar un análisis NOlseq.

Entre los DEGs que se encuentran inducidos destacan por su alto nivel de inducción en presencia de extractos de raíz de arroz varias agrupaciones génicas. Así, el *cluster* que se encuentra más inducido en estas condiciones (200-700 veces) comprende los genes AzCIB_4712 a AzCIB_4716 y codifica un posible sistema de transporte de ácidos tricarboxílicos (familia de transportadores TRAP) y la porina de membrana externa asociada (AzCIB_4720). También se encuentra significativamente inducido (4-93 veces) un *cluster* (AzCIB_2307-AzCIB_2320) que codifica un presunto transportador ABC de aminoácidos y enzimas oxidoreductasas dependientes de FAD que podrían estar implicadas en la síntesis del grupo hemo. Además, el gen AzCIB_2320, que codifica una posible indolacetaldehído-deshidrogenasa, podría estar implicado en una ruta de oxidación de la cadena lateral del Trp para la síntesis de IAA (Fig. 4) (Sheibani-Tezerji *et al.*, 2015). Otras funciones metabólicas que se encuentran inducidas en presencia de extractos de arroz son: (i) *clusters* codificantes de bombas de extrusión, especialmente de tipo RND, e.g. AzCIB_1186 a AzCIB_1191 (entre 6 y 11 veces), AzCIB_2880 a AzCIB_2885 (entre 4 y 31 veces) y AzCIB_2429-AzCIB_2430 (alrededor de 4 veces); (ii) genes relacionados con el metabolismo secundario, como los implicados en el metabolismo periférico de los fenilpropanoides, AzCIB_2728 a AzCIB_2733 (entre 6 y 49 veces), diterpenoides, AzCIB_2440 a AzCIB_2444 (entre 4 y 9 veces), y de terpenoides y poliquétidos, AzCIB_4439-AzCIB_4444 (entre 3 y 9 veces); (iii) dos *clusters* de genes que codifican transportadores TRAP posiblemente relacionados con el transporte de ácidos dicarboxílicos, i.e., AzCIB_0887-AzCIB_0889 (entre 5 y 12 veces) y

AzCIB_3752-AzCIB_3754 (entre 22 y 42 veces); (iv) genes implicados en la desnitrificación, tales como los genes *nap* (nitrato reductasa periplásmica) AzCIB_0231-AzCIB_0233 (entre 3 y 12 veces), los genes *nor* (óxido nítrico reductasa) AzCIB_1316-AzCIB_1320 (entre 4 y 54 veces) y los genes *nos* (óxido nitroso reductasa) AzCIB_2188-AzCIB_2189 (entre 6 y 7 veces); (v) genes *pim* implicados en la β -oxidación de ácidos grasos dicarboxílicos (Harrison y Harwood, 2005) tales como los genes AzCIB_2911-2917 (entre 10 y 50 veces); (vi) un *cluster* que codifica una posible formiato deshidrogenasa de membrana AzCIB_0059-AzCIB_0062 (entre 3 y 5 veces); (vii) algunos genes *tod* de degradación aeróbica de tolueno, AzCIB_4413-AzCIB_4417 (entre 3 y 6 veces); (viii) genes *fad* para la β -oxidación de ácidos grasos, AzCIB_4200-AzCIB_4206 (entre 7 y 23 veces); (ix) dos genes contiguos de función desconocida AzCIB_3432-AzCIB_3433 (entre 6 y 11 veces) de los cuales AzCIB_3432 es similar al gen *osmY*, inducible en condiciones de hiperosmolaridad (Yim y Villarejo, 1992; Rosso *et al.*, 2008); (x) varios *clusters* relacionados con el metabolismo de aminoácidos como los genes AzCIB_0354-AzCIB_0357 (entre 3 y 46 veces) posiblemente implicados en la degradación de valina, leucina o isoleucina; los genes AzCIB_1078-AzCIB_1080 (alrededor de 3 veces) cuyo primer gen está relacionado con la degradación de arginina, los genes AzCIB_3391-AzCIB_3395 que codifican un transportador ABC de aminoácidos (entre 3 y 10 veces); (xi) un *cluster* (AzCIB_0814-AzCIB_0826) formado por genes que codifican diversas proteínas relacionadas con la síntesis de exopolisacárido (entre 4 y 51 veces), y que será objeto de estudio más detallado en el apartado 6 de Resultados.

Entre los genes reprimidos en presencia de extractos de arroz cabe destacar: (i) dos subunidades de la enzima responsable de la reducción del tetrionato AzCIB_0117-AzCIB_0118 (entre 3 y 5 veces); (ii) genes del metabolismo central como el gen AzCIB_0750 (10 veces) que codifica una acetil-CoA sintetasa, el gen AzCIB_0851 (3 veces) que codifica la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, o el gen AzCIB_2038 (9 veces) que codifica una acil-CoA deshidrogenasa; (iii) genes que codifican flavoproteínas como AzCIB_2039, AzCIB_2040 y AzCIB_2380 (7, 5 y 4 veces, respectivamente); (iv) un gen que codifica una fenilpiruvato descarboxilasa, AzCIB_1933 (4 veces), que podría estar relacionada con la síntesis de IAA catalizando el paso de indol-3-piruvato a indol-

Resultados

3-acetaldehído; (v) tres genes de la ruta box de degradación aeróbica de benzoato AzCIB_4634-AzCIB_4636 (entre 4 y 12 veces); (vi) un conjunto de *clusters* que codifican proteínas relacionadas con la obtención de energía, e.g. ATPasas (AzCIB_0085-AzCIB_0089, entre 2 y 5 veces), NADH deshidrogenasa (AzCIB_2984 - AzCIB_2991, entre 2 y 4 veces) y citocromos (AzCIB_3103 - AzCIB_3105, 4 veces); (vii) genes del metabolismo de aminoácidos, e.g. genes del metabolismo de la fenilalanina (AzCIB_0333-AzCIB_0340, entre 3 y 7 veces); valina, leucina e isoleucina (AzCIB_3170-AzCIB_3175, entre 4 y 13 veces); genes de rutas metabólicas de degradación de leucina e isoleucina (AzCIB_0428-AzCIB_0432, entre 5 y 10 veces) y genes implicados en la degradación de lisina (AzCIB_1065-AzCIB1071, entre 3 y 7 veces); (viii) genes del ciclo de Krebs, e.g. AzCIB_1864-AzCIB_1868 (entre 3 y 6 veces) y la malato deshidrogenasa AzCIB_1872 (3 veces); (ix) el gen AzCIB_3782 que codifica la proteína FtsA implicada en la división celular.

6.- Papel de un posible *cluster* de biosíntesis/modificación de exopolisacárido en la interacción entre *Azoarcus* sp. CIB y el arroz

El exopolisacárido bacteriano está implicado en multitud de funciones vitales para la célula, ayudando a la cohesión y adhesión a superficies bióticas y abióticas mediante la agregación celular y la formación de *biofilms* (Schmid *et al.*, 2015). Además, como se ha indicado en la Introducción, durante la interacción planta-bacteria el exopolisacárido puede afectar indirectamente al crecimiento del hospedador debido a su papel como inductor de la ISR. Algunos estudios previos han sugerido la participación del exopolisacárido en el establecimiento de interacciones planta-bacteria tanto simbióticas, entre rizobios y leguminosas (Janczarek *et al.*, 2015), como rizosféricas, en *P. fluorescens* (Nian *et al.*, 2010) y endofíticas, en *G. diazotrophicus* (Meneses *et al.*, 2011).

En el genoma de *Azoarcus* sp. CIB se han identificado tres *clusters* génicos posiblemente relacionados con la síntesis y modificación del exopolisacárido (Tabla 2) (Martín-Moldes *et al.*, 2015). Uno de estos *clusters* (Fig. 35A) se ha visto

fuertemente inducido a nivel transcripcional en presencia de extractos de arroz, tal y como se ha indicado en el apartado anterior. Para determinar si dicho *cluster* está implicado en la interacción de la cepa CIB con el arroz, se procedió a su inactivación mediante la construcción de una disrupción insercional en el gen AzCIB_0818 (*epsF*). El análisis por RT-PCR confirmó la existencia de efectos polares tras la disrupción del gen *epsF* al no observarse expresión ni de este gen ni del gen AzCIB_0819, localizado en posición 3' (Fig. 35B).

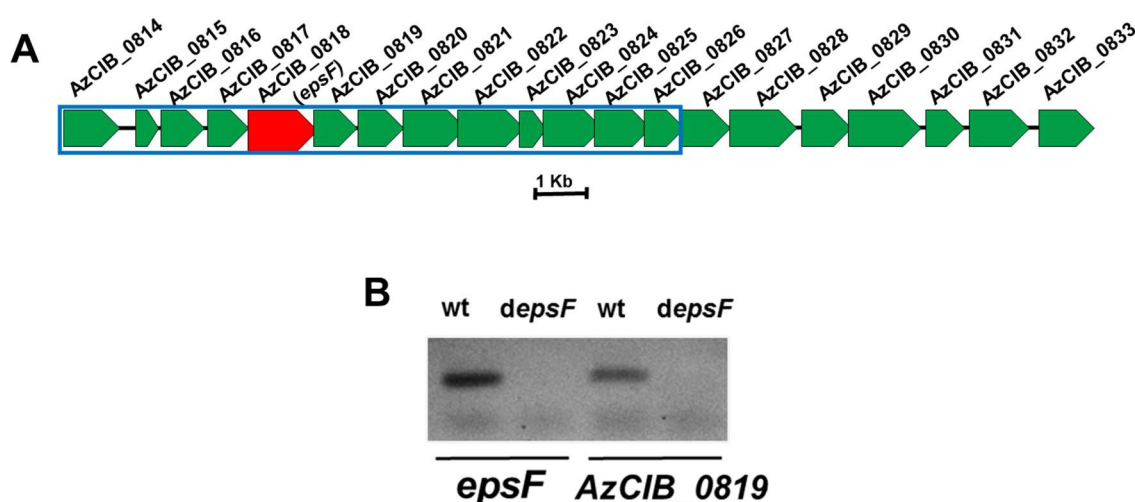


Figura 35. Organización génica de un presunto *cluster* de biosíntesis de exopolisacárido en *Azoarcus* sp. CIB. A) Los genes se presentan a escala. En el recuadro se destacan los genes que aparecieron inducidos en el análisis transcriptómico. El gen *epsF* (rojo), fue mutado mediante inserción del plásmido pK18*mobepsF* (Tabla 5), de acuerdo al protocolo del apartado 5 de Materiales y Métodos, obteniéndose la cepa *Azoarcus* sp. CIB*depsF*. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR de los genes *epsF* y AzCIB_0819 obtenidos a partir de RNA extraído de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (wt) y *Azoarcus* sp. CIB *depsF* (*depsF*) cultivadas en medio VM hasta una A_{600} de 0,6. La extracción del RNA y la técnica de RT-PCR se realizó siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos, utilizando para la amplificación de los fragmentos *epsF* y AzCIB_0819 las parejas de oligonucleótidos 5'RT*epsF*/3'RT*epsF* y 5'RT0819/3'RT0819, respectivamente (Tabla 6).

Para la caracterización fenotípica de la cepa mutante se analizó su morfología de colonia en un medio de cultivo sólido suplementado con rojo Congo, tinción que permite una mejor visualización de los cambios en la morfología de la colonia por su unión a los polisacáridos de la superficie bacteriana (Chung *et al.*, 2003). La superficie de las colonias formadas por la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*depsF* resultó ser más rugosa que las de la cepa silvestre (Fig. 36A), lo que sugiere que se está produciendo algún cambio en la estructura del exopolisacárido

Resultados

en la cepa mutante, y apunta a un papel del *cluster* identificado en la producción/secreción/modificación del exopolisacárido en *Azoarcus* sp. CIB.

A continuación, se procedió a estudiar la capacidad de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*depsF* para colonizar las raíces de arroz como endófito (Fig. 36B). El número de endófitos recuperados de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*depsF* ($1,65 \times 10^4$ bacterias) representó un 36% menos de los endófitos recuperados de raíces inoculadas con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB conteniendo el plásmido control pSEVA237 ($4,57 \times 10^4$ bacterias). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la inactivación del *cluster* reduce la capacidad de interacción de la bacteria con la planta del arroz, y apuntan a un posible papel beneficioso del exopolisacárido en el estilo de vida endófito de *Azoarcus* sp. CIB.

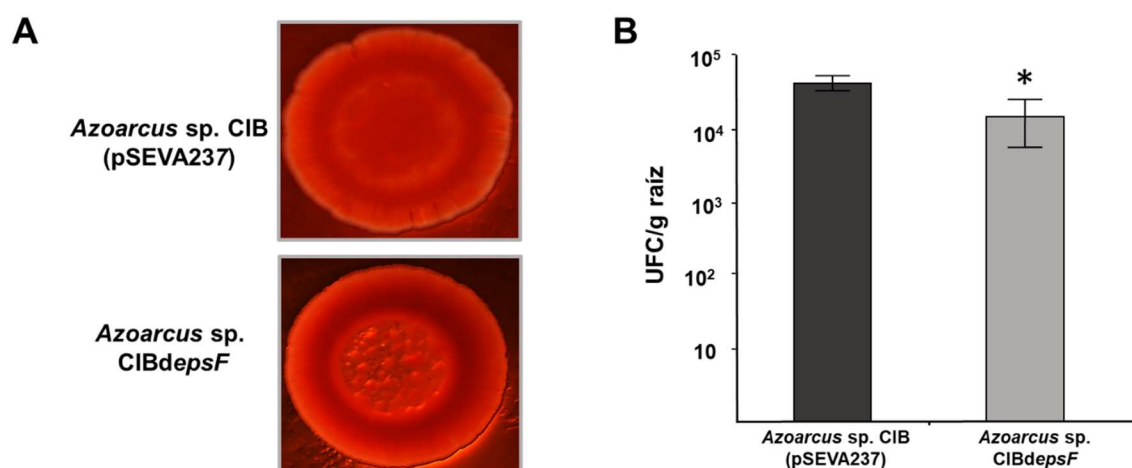


Figura 36. Morfología de colonia y capacidad de colonización de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*depsF*. **A)** Morfología de las colonias de la cepa parental, *Azoarcus* sp. CIB, conteniendo el plásmido control pSEVA237, y de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*depsF* cultivadas en medio sólido VM suplementado con rojo Congo (0,5 g/l). Las colonias se visualizaron con una lupa Leica MZ16FA. **B)** Cuantificación del número de endófitos extraídos de raíces de arroz tras la inoculación con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237) y *Azoarcus* sp. CIB*depsF*. Las plántulas se crecieron a 25 °C durante 5 días (ver sección 6.3 Materiales y Métodos). En el gráfico se muestran los valores de UFC por gramo de raíz (peso fresco) de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. El asterisco muestra la significancia de las diferencias observadas al comparar las dos situaciones y aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni. $P < 0,05$ (*).

7.- Implicación de los niveles de di-GMPc en el establecimiento del estilo de vida endófito en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha indicado en la Introducción (apartado 3), el di-GMPc es un segundo mensajero bacteriano que está implicado en la regulación de multitud de funciones celulares. Sin embargo, su papel en las interacciones beneficiosas planta-bacteria y, más concretamente, en relaciones endófitas, apenas ha sido estudiado. En los apartados anteriores se ha demostrado la implicación de algunos componentes celulares (*pili* tipo IV, flagelo y exopolisacárido) en la colonización de las raíces del arroz por *Azoarcus* sp. CIB (Römling *et al.*, 2013). Por ello se decidió investigar cómo afecta la variación de los niveles intracelulares de di-GMPc a la colonización endofítica de *Azoarcus* sp. CIB y analizar si estas variaciones afectaban directamente a la expresión de los genes que codifican los *pili*, el flagelo y el exopolisacárido.

Para la realización de estos experimentos se utilizaron cepas de *Azoarcus* sp. CIB que producen diferentes niveles de di-GMPc al ser portadoras de plásmidos que expresan enzimas de síntesis (diguanylatto ciclasa, DGC) o degradación (fosfodiesterasa, PDE) de di-GMPc. Las tres cepas seleccionadas contienen los plásmidos (Tabla 5): (i) pIZ1016, plásmido control; (ii) pIZ2133, plásmido derivado de pIZ1016 que expresa, bajo control del promotor *P_{tac}* y el regulador *LacI^q*, el gen PA2133 de *P. aeruginosa* PAO1 que codifica una fosfodiesterasa de di-GMPc previamente caracterizada (Hickman *et al.*, 2005); (iii) pIZ4959, plásmido derivado de pIZ1016 que expresa, bajo control del promotor *P_{tac}* y el regulador *LacI^q*, el gen PP4959 de *P. putida* KT2440 que codifica una diguanylatto ciclasa (Matilla *et al.*, 2011).

Las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) y *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) son, por tanto, cepas con niveles de di-GMPc reducidos o incrementados, respectivamente, con respecto a la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (pIZ1016) (Martín-Moldes *et al.*, 2016). Debido a la dificultad técnica de añadir el inductor IPTG en la endosfera del arroz para asegurar la expresión de los genes PA2133 y PP4959, se comprobó, en ausencia de inductor, si se observaban los fenotipos asociados a las variaciones en los niveles de di-GMPc. En concreto, se estudió la

Resultados

variación de la movilidad de tipo *swarming* y *swimming* y la morfología de las colonias en placa (Fig. 37). Tanto en los ensayos de *swarming* como de *swimming* la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) veía aumentada su movilidad respecto a la cepa control con el plásmido vacío. Por el contrario, la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) reducía levemente su capacidad de movilidad de tipo *swarming* y de forma más drástica su movilidad de tipo *swimming* respecto a la cepa control (Fig. 37).

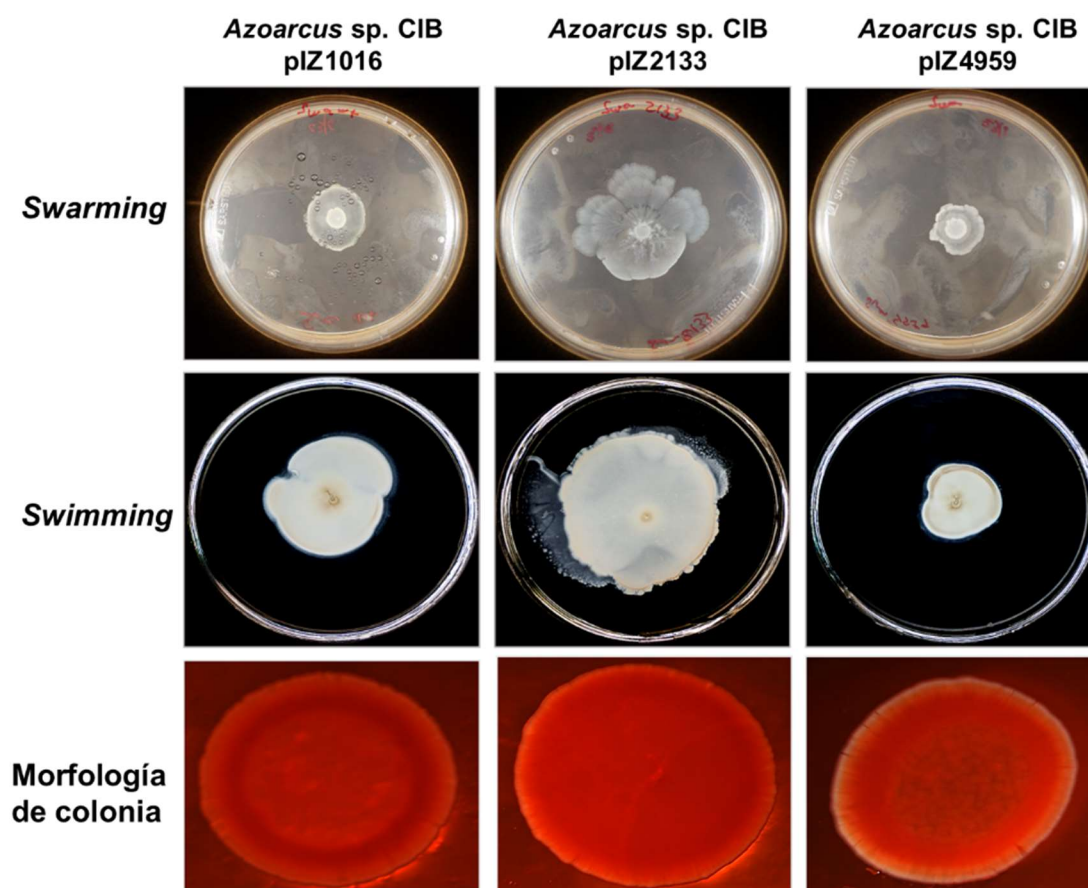


Figura 37. Movilidad y morfología de las colonias de cepas de *Azoarcus* sp. CIB que expresan genes implicados en el metabolismo del di-GMPc. Se caracterizó la movilidad de tipo *swarming* en placas de medio MC-piruvato al 0,2% (m/v) con agar 0,4%; de tipo *swimming* en placas de medio VM con agar 0,3%, y la morfología de las colonias en medio VM agar 1,5% suplementado con rojo Congo (0,5 g/l) (apartados 6.1.3 y 6.1.4 de Materiales y Métodos). Las placas se inocularon con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pIZ1016) (plásmido vacío), *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) (expresión de la fosfodiesterasa PA2133) y *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) (expresión de la diguanilato ciclasa PP4959). Las placas se cultivaron durante 7 días a 30°C.

Los resultados obtenidos son consistentes con los fenotipos esperados cuando se disminuyen los niveles de di-GMPc (aumento de la movilidad) o se aumentan los niveles de di-GMPc (promoción del estilo de vida sésil), de acuerdo a lo descrito en la literatura (Jenal *et al.*, 2017). Respecto a la morfología de la colonia, la cepa modificada con el plásmido pIZ2133 generó colonias más lisas y llanas, mientras que la expresión del plásmido pIZ4959 hizo que las colonias fuesen más rugosas, lo que también está de acuerdo con los datos de la literatura que indican que un aumento en los niveles de di-GMPc supone una mayor síntesis de exopolisacárido y, consecuentemente, una mejor capacidad para la formación de biofilm y formación de colonias rugosas (Jenal *et al.*, 2017).

Para saber si la modificación de los niveles de di-GMPc afectaba a la expresión de los genes relacionados con los fenotipos diferenciales observados (movilidad y morfología de colonia), se realizó un análisis de expresión, mediante RT-PCR cuantitativa, de los genes *pilY1* (gen codificante para una proteína implicada en la síntesis y estabilización de *pili* tipo IV), *pilC* (gen codificante de una proteína estructural del flagelo) y *epsF* (gen asociado a la síntesis de exopolisacárido). Los resultados obtenidos (Fig. 38) revelaron que la expresión del gen *epsF* no se ve significativamente alterada en ninguna de las dos cepas que poseen niveles modificados de di-GMPc, sugiriendo que el control del exopolisacárido por di-GMPc se efectúa a otro nivel. De igual forma, los genes *pilY1* y *pilC* tampoco veían significativamente alterada su expresión en *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) respecto al control con plásmido vacío. Sin embargo, los resultados de expresión de estos dos genes en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) indicaron una represión de 3-3,5 veces respecto al control, lo que explicaría el descenso de movilidad observado tanto en los ensayos de *swarming* como en los de *swimming*.

Resultados

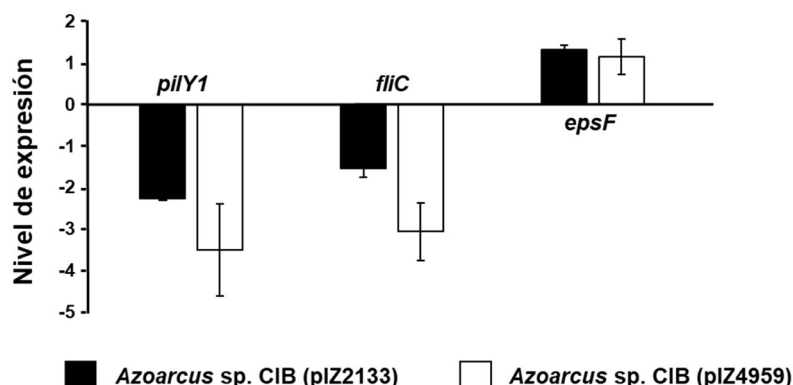


Figura 38. Expresión de los genes *pilY1*, *fliC* y *epsF* en cepas de *Azoarcus* sp. CIB que poseen diferentes niveles de di-GMPc. Los niveles de transcrito de los genes *pilY1*, *fliC* y *epsF*, en las cepas *Azoarcus* sp. CIB (plZ2133) y *Azoarcus* sp. CIB (plZ4959) crecidas en medio VM aeróbico durante 24 h, se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa a partir del RNA total extraído y procesado según se detalla en los apartados 3.4 y 3.5 de Materiales y Métodos. La expresión de los genes se relativizó, según el método $\Delta\Delta C_t$, a la expresión correspondiente de cada gen en la cepa control *Azoarcus* sp. CIB (plZ1016) utilizándose como control interno la expresión del gen constitutivo *dnaE*. Se indica el valor medio y la desviación estándar correspondiente a los resultados de tres experimentos independientes.

Tras la caracterización fenotípica de las cepas de *Azoarcus* sp. CIB con niveles modificados de di-GMPc, se realizaron ensayos de colonización de raíces de plántulas de arroz. Como puede observarse en la figura 39, tanto la disminución como el aumento de los niveles de di-GMPc afectaban negativamente a la capacidad endofítica de *Azoarcus* sp. CIB. Cuando las plántulas se inocularon con *Azoarcus* sp. CIB (plZ2133) se recuperaron $1,46 \times 10^3$ bacterias/g raíz, valor que corresponde a una caída de más de un orden de magnitud respecto a los endófitos extraídos de la inoculación con la cepa control ($2,5 \times 10^4$ bacterias/g raíz). La inoculación con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (plZ4959) no tuvo un efecto negativo tan drástico en la interacción con la planta, recuperándose $7,63 \times 10^3$ bacterias/g raíz, lo que significa una pérdida de eficacia en la colonización del 70% con respecto a la cepa control. Por lo tanto, estos datos en su conjunto sugieren que la modificación de los niveles de di-GMPc, tanto su aumento como su disminución, tienen un efecto negativo sobre la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB de vivir como endófito en las raíces del arroz.

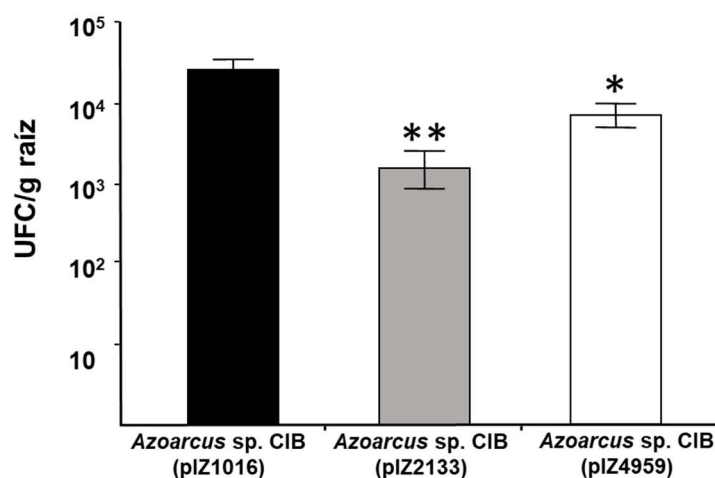


Figura 39. Cuantificación de distintas cepas de *Azoarcus* sp. CIB con diferentes niveles de di-GMPc en las raíces del arroz. Se inocularon plántulas de arroz con las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pIZ1016) (plásmido vacío), *Azoarcus* sp. CIB pIZ2133 (expresión del gen PA2133) y *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) (expresión del gen PP4959). Las plantas se crecieron a 25 °C durante 5 días, tras lo cual se contabilizaron las bacterias presentes en el interior de sus raíces que previamente se desinfectaron superficialmente (ver sección 6.3 de Materiales y Métodos). En el gráfico se muestran los valores de UFC por gramo de raíz (peso fresco) de tres experimentos independientes, mostrándose también la desviación estándar. Los asteriscos muestran la significancia de las diferencias observadas al comparar las cepas con niveles modificados de di-GMPc respecto a la cepa control y aplicar el método estadístico de análisis de varianza ANOVA y test de Bonferroni $P < 0,01$ (**); $P < 0,05$ (*).

8.- Resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a metales pesados y metaloides

Como se ha indicado en el apartado 8.1 de la Introducción, el análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB reveló la presencia de varias regiones anotadas como posibles *clusters* de resistencia a metales y metaloides, muchos de ellos localizados en la isla genómica VII (Tabla 3) (Martín-Moldes *et al.*, 2015). Por ello se decidió estudiar los niveles de resistencia de la cepa CIB a diferentes metales y metaloides. Para ello se cultivó *Azoarcus* sp. CIB en medio mínimo MC con piruvato al 0,2% (m/v) como única fuente de carbono y energía, tanto aeróbica como anaeróbicamente, en presencia de diversas concentraciones de los metales objeto de estudio. La tabla 10 muestra la concentración mínima inhibitoria (MIC) de *Azoarcus* sp. CIB frente a los diferentes metales utilizados.

Resultados

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de *Azoarcus* sp. CIB frente a los metales y metaloides testados en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v).

Compuesto	Concentración Mínima Inhibitoria (mM)	
	-O ₂	+O ₂
Arseniato (Na ₃ AsO ₄)	150	150
Arsenito (NaAsO ₂)	1,5	1
Selenato (Na ₂ SeO ₄)	1	1
Selenito (Na ₂ SeO ₃)	8	<0,5
Telurito (K ₂ TeO ₃)	1	3
Cadmio (CdCl ₂)	1,5	1,5
Níquel (NiCl)	1,5	1,5
Zinc (ZnCl ₂)	1,5	1,5
Cobre (CuCl ₂)	<0,1	<0,1
Mercurio (HgCl ₂)	<0,1	<0,1

Estos resultados confirman las predicciones derivadas del análisis *in silico* del genoma y revelan que *Azoarcus* sp. CIB es capaz de resistir concentraciones relativamente elevadas de ciertos metales/metaloides tales como el arseniato, arsenito, seleniato, selenito, telurito, cadmio, níquel y zinc.

9.- Resistencia y formación de nanopartículas de selenio y telurio por *Azoarcus* sp. CIB

De entre los compuestos probados a los que *Azoarcus* sp. CIB presentaba resistencia llamaron especialmente la atención dos metaloides, el selenio y el telurio, al observarse que cuando se crecía la cepa CIB en presencia de oxianiones de estos compuestos, el medio de cultivo se tornaba de una intensa coloración naranja (en presencia de selenito) y negra (en el caso del telurito), sugiriendo su reducción a su forma elemental (Klonowska *et al.*, 2005; Stolz *et al.*, 2006). Previamente se había descrito la existencia de microorganismos capaces de acoplar la reducción del selenito/telurito a la formación de nanopartículas metálica responsables de la coloración que aparecía en los medios (Narayanan y Sakthivel, 2010). Dado el interés biotecnológico que posee tanto la resistencia a metales

tóxicos como la producción de nanopartículas, se procedió a una investigación más exhaustiva de los procesos de resistencia y reducción de oxianiones de Se y Te así como la posibilidad de formar nanopartículas por parte de la bacteria *Azoarcus* sp. CIB. En estos estudios se puso un mayor énfasis en la resistencia a selenito debido a la mayor tolerancia que la bacteria presentó frente a este compuesto, lo cual facilitó su investigación.

9.1.- Resistencia y reducción del selenito por *Azoarcus* sp. CIB

Como se detalla en la Introducción, el selenio es un metaloide esencial que presenta diversas formas iónicas que resultan tóxicas para los organismos vivos a altas concentraciones (Stolz *et al.*, 2006). A pesar de ello, tanto el selenio como sus oxianiones poseen diversas aplicaciones industriales y la producción biológica SeNPs se ha convertido en una importante alternativa a la síntesis química (Shirsat *et al.*, 2015). *Azoarcus* sp. CIB tolera, anaeróbicamente, concentraciones relativamente altas de selenito, con una MIC de 8 mM (Tabla 10), por lo que se decidió abordar en detalle el estudio de la resistencia y bioconversión del selenito en *Azoarcus* sp. CIB.

La viabilidad de la cepa CIB en presencia de selenito 1 mM se monitorizó a lo largo de una curva de crecimiento en medio MC suplementado con piruvato al 0,2% (m/v) (Fig. 40B). Se pudo comprobar que a las 72 h de cultivo el medio comenzó a adoptar una coloración anaranjada que se volvía más intensa con el paso de los días (Fig.40A), sugiriendo la reducción del selenito a la forma elemental Se^0 . Además, se pudo constatar que el selenito producía la muerte (y probable lisis) celular al observarse que la viabilidad en el medio con selenito decreció considerablemente a partir de las 72 horas respecto a los cultivos sin selenito, llegándose a obtener una disminución de UFCs de más de dos órdenes de magnitud al cabo de 7 días (Fig. 40B).

Para determinar la reducción del selenito a lo largo del tiempo se tomaron muestras en diferentes puntos de la curva de crecimiento y se midieron las concentraciones de las formas iónicas del selenio mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Como se puede observar en la gráfica de la figura 40B, la desaparición de selenito se produce a lo

Resultados

largo de la fase estacionaria del crecimiento, coincidiendo con la pérdida de viabilidad celular. La implicación de *Azoarcus* sp. CIB en la reducción del selenito fue confirmada al no observarse ni cambio en la tonalidad del medio ni caída en la concentración de selenito cuando se incubó el medio con selenito pero sin inóculo bacteriano.

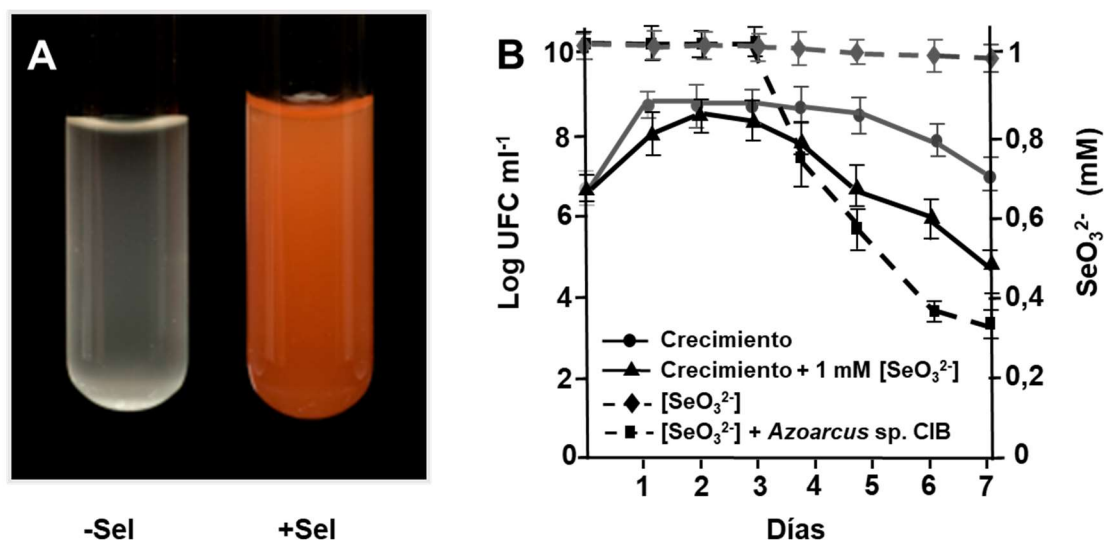


Figura 40. Crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB anaeróticamente en medio suplementado con selenito. A) Imágenes de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos anaeróticamente en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) durante 5 días en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de selenito 1mM. **B)** Curva de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) en ausencia (círculos) o presencia (triángulos) de selenito 1 mM en condiciones anaeróbicas, y cinética de reducción de selenito en ausencia (rombos) o en presencia (cuadrados) de células. Los resultados mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Para dilucidar si dicha reducción era responsabilidad de algún componente celular termolábil, se obtuvieron extractos celulares crudos y sobrenadantes de los cultivos, y en ambos casos una alícuota se sometió a un tratamiento térmico. Así, se demostró que tanto los sobrenadantes (tratados con calor y sin tratar) y los extractos celulares inactivados por calor fueron incapaces de reducir selenito a Se⁰. Sin embargo, el extracto crudo sin tratamiento de calor produjo un intenso color naranja (Fig. 41), sugiriéndose la participación de una enzima, o algún otro componente intracelular que se inactiva a altas temperaturas, en la reducción de selenito a selenio elemental en *Azoarcus* sp. CIB.

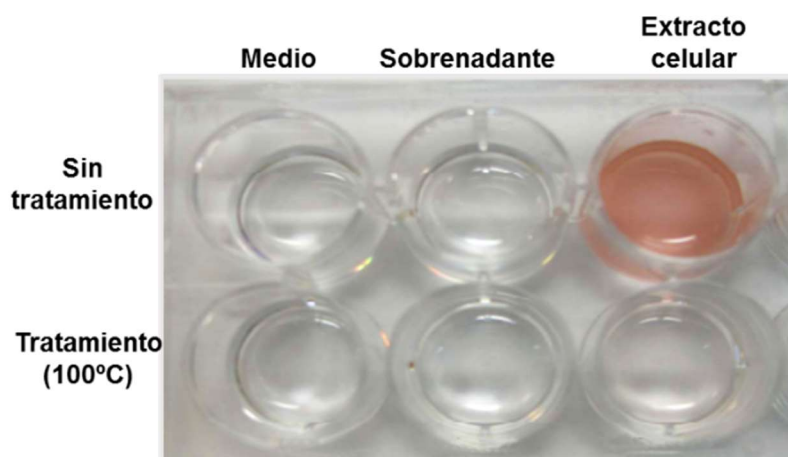


Figura 41. Determinación de la fracción celular responsable de la reducción de selenito a selenio. Se recogieron en fase estacionaria cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos anaeróbicamente en MC con piruvato al 0,2% (m/v), tratándose por separado los sobrenadantes y los extractos celulares tal y como se detalla en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos. Tras la adición de selenito 1mM, se observó su reducción tan solo en la muestra correspondiente a extractos celulares crudos sin inactivación por calor.

9.1.1.- Producción de SeNPs por *Azoarcus* sp. CIB

Dado que un buen número de microorganismos son capaces de acoplar la reducción de oxianiones de metales/metaloideos a la producción de nanopartículas (Stolz *et al.*, 2006), se analizó si la cepa CIB era capaz de asociar la reducción de selenito a la producción de SeNPs. Para ello, se cultivó en anaerobiosis la cepa CIB en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) en presencia de selenito 1 mM y, cuando el medio viró a color naranja intenso (5 días), se recuperaron las células por centrifugación y éstas se observaron empleando para ello tanto técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de microscopía electrónica de barrido.

Inicialmente, se realizaron inclusiones de células de *Azoarcus* sp. CIB crecidas en presencia de selenito para su observación mediante TEM siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.2.2 de Materiales y Métodos. Las imágenes obtenidas permitieron confirmar la presencia de nanopartículas esféricas que se localizaban tanto en el exterior de las células (Fig. 42A) como en el citoplasma bacteriano (Fig. 42B), sugiriendo que la síntesis se producía intracelularmente. La obtención de imágenes mediante SEM (ver apartado 8.3 de Materiales y Métodos) permitió apreciar que las SeNPs aparecían en muchas ocasiones asociadas a los

Resultados

restos celulares, posiblemente como resultado de la lisis celular (Fig. 42C), sugiriendo que las nanopartículas no son activamente exportadas al medio, sino liberadas tras la muerte y la lisis bacteriana. Para mejorar la caracterización de las SeNPs, se procedió a su purificación. Para ello se crecieron células de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato suplementado con selenito 1 mM durante 7 días, tras lo cual se lisaron las células y se separaron las nanopartículas de los restos celulares mediante centrifugación en fase orgánica siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.2. de Materiales y Métodos. Tras la purificación, se obtuvo un sedimento naranja que previsiblemente contenía las nanopartículas purificadas. Mediante SEM se confirmó la ausencia de bacterias y se visualizaron agrupaciones de nanopartículas esféricas de diferentes diámetros (Fig. 42D). El tamaño promedio de las SeNPs producidas por *Azoarcus* sp. CIB en estas condiciones fue de 88 ± 40 nm, y la distribución de tamaños se muestra en la figura 43E.

Para determinar la composición química y la pureza de las SeNPs se empleó la técnica de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) a partir de muestras observadas por TEM (ver la sección 8.2.2 de Materiales y Métodos para más detalles). Los resultados mostraron los picos de absorción específicos para el selenio (Fig. 42F), mientras que el análisis de difracción de electrones (SAED) reveló un patrón de anillos difusos, lo cual muestra que el selenio que conforma las nanopartículas se organiza en una estructura amorfa (Fig. 42F).

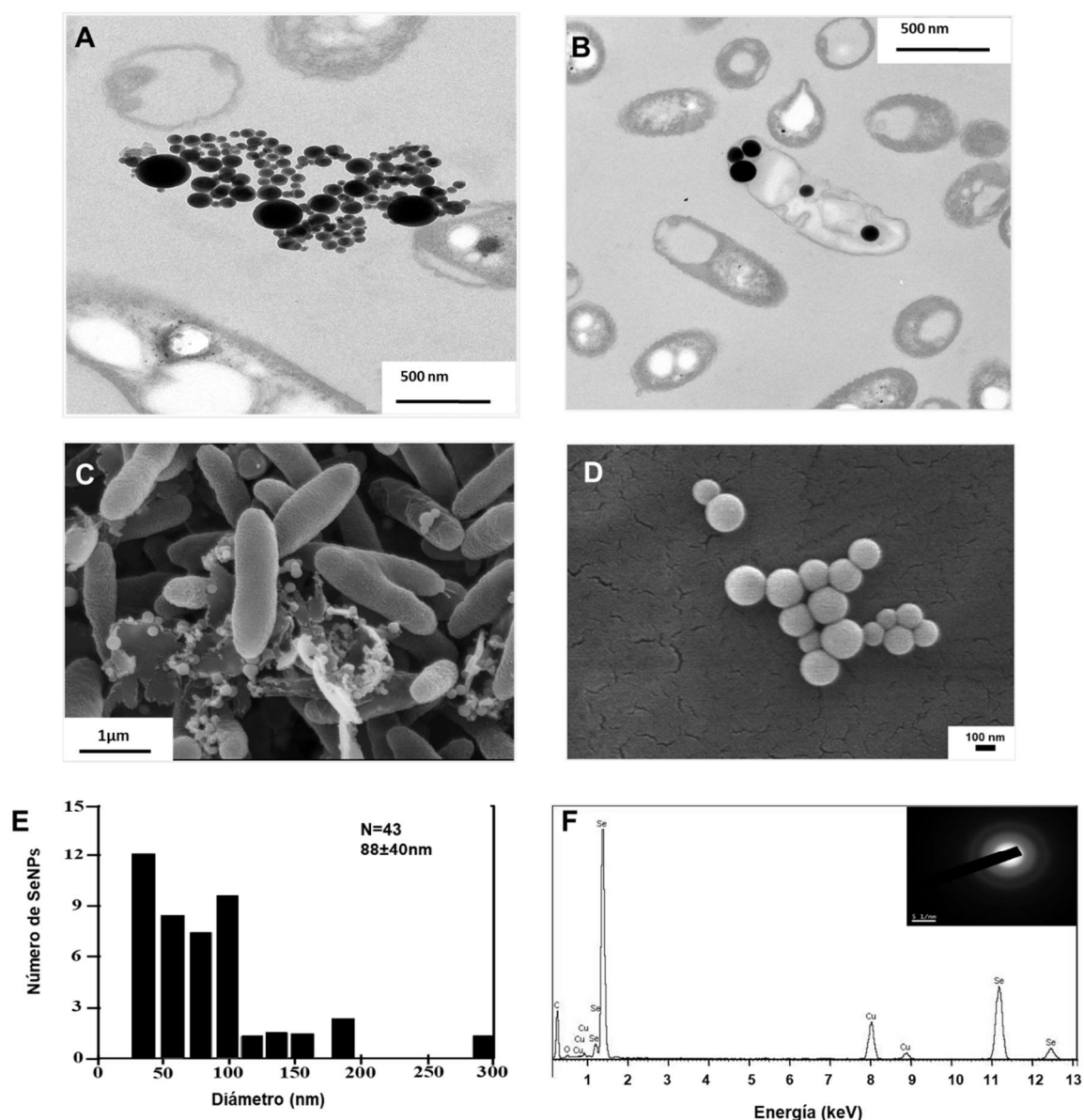


Figura 42. Análisis y caracterización de las SeNPs producidas por *Azoarcus* sp. CIB. Las imágenes de microscopía electrónica se realizaron a partir de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos anaeróbicamente en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) suplementado con una concentración de selenito 1mM. **A y B)** Imágenes de TEM de secciones de *Azoarcus* sp. CIB, preparadas según el protocolo del apartado 8.2.2 de Materiales y Métodos, que muestran SeNPs en el exterior e interior de las células, respectivamente. **C)** Imagen de SEM en la que se pueden observar SeNPs adheridas a restos celulares. **D)** Nanopartículas de selenio observadas con SEM tras su purificación de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB. **E)** Distribución del tamaño de las SeNPs producidas por *Azoarcus* sp. CIB. **F)** Espectro del análisis EDX de una nanopartícula de selenio en el que se confirma su composición al observarse los picos característicos del selenio. En la esquina superior derecha se presenta una imagen del análisis de difracción SAED que muestra un patrón de halos difusos que confirma la naturaleza amorfa de las NPs.

9.1.2.- Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a selenito

Como ya se ha explicado anteriormente, la reducción de selenito en *Azoarcus* sp. CIB se produce durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, durante la fase exponencial las bacterias son capaces de resistir selenito y, por ello, deberán utilizar un mecanismo de detoxificación que no implique necesariamente la reducción de la forma iónica. De acuerdo con esta observación, y con las realizadas en otras bacterias (Kessi, 2006; B. Li *et al.*, 2014; Staicu *et al.*, 2015), se planteó la posibilidad de que en la cepa CIB existiese algún sistema de exportación de selenito dependiente de energía. Mecanismos similares se han postulado para otras bacterias, como *R. rubrum* (Kessi, 2006), y permitiría que solamente cuando las células están altamente energizadas, por ejemplo en la fase exponencial de crecimiento, el selenito pueda ser expulsado de la célula. Sin embargo, en la fase estacionaria cuando las bacterias ven mermada su capacidad energética, el selenito podría permanecer en el citoplasma durante el tiempo necesario para ser reducido a selenio metálico.

Para confirmar esta hipótesis, se cultivó la cepa CIB anaeróbicamente en: (i) condiciones limitantes de fuente de carbono, o (ii) condiciones limitantes de aceptor de electrones. En ambos casos fue posible observar la presencia de la característica coloración naranja en 3 días, tras llegar el cultivo a la fase estacionaria (Fig. 43). Sin embargo, si se evitaban las condiciones limitantes mediante la adición de más fuente de carbono y aceptor de electrones, manteniéndose así el cultivo en la fase exponencial, se conseguía evitar la reducción del selenito (Fig. 43).

Estos resultados confirmaban que tanto la limitación de fuente de carbono como la de aceptor de electrones induce la reducción del selenito en cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB.

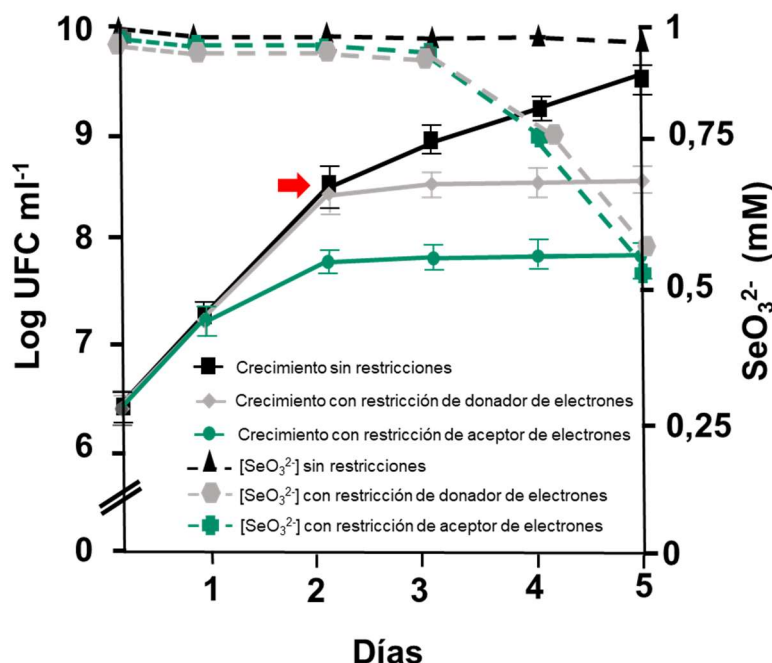


Figura 43. Efecto de la limitación de nutrientes en el medio de cultivo sobre la reducción de selenito por *Azoarcus* sp. CIB. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato y selenito 1 mM en tres condiciones de cultivo diferentes, según se detalla en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos: (i) limitación de piruvato (donador de electrones) al añadir esta fuente de carbono al 0,1%, (ii) limitación de nitrato al añadir este aceptor final de electrones a 5 mM (iii) sin limitación de piruvato (0.2%) ni nitrato (10 mM), suplementando con más piruvato y nitrato al final de la fase exponencial (flecha roja). Se monitorizó tanto el crecimiento bacteriano (en UFC/ml) como el consumo de selenito. Los resultados mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

De forma complementaria, se estudió la reducción de selenito en células a las que se les disminuyó significativamente su capacidad de obtención de energía mediante la adición de una concentración no letal del desacoplante de membrana 2,4-dinitrofenol (DNP). El DNP disipa el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, de forma que se bloquea la síntesis de ATP (Pinchot, 1967). Por lo tanto, la adición de DNP a los cultivos de la cepa CIB durante la fase exponencial debería inducir una disminución de los niveles energéticos en las células comprometiendo así su capacidad para exportar el selenito al exterior celular. Mientras que los cultivos crecidos con selenito en ausencia de DNP no mostraron la aparición de ningún color durante la fase exponencial (Fig. 44B), los cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos en presencia de selenito y DNP mostraron el característico color naranja indicativo de la reducción de selenito a selenio (Fig. 44B). La reducción del selenito desde el comienzo de la fase exponencial, así

Resultados

como la consiguiente acumulación de SeNPs intracelulares, fue confirmada mediante ICP y TEM (Figs. 44A y 44C).

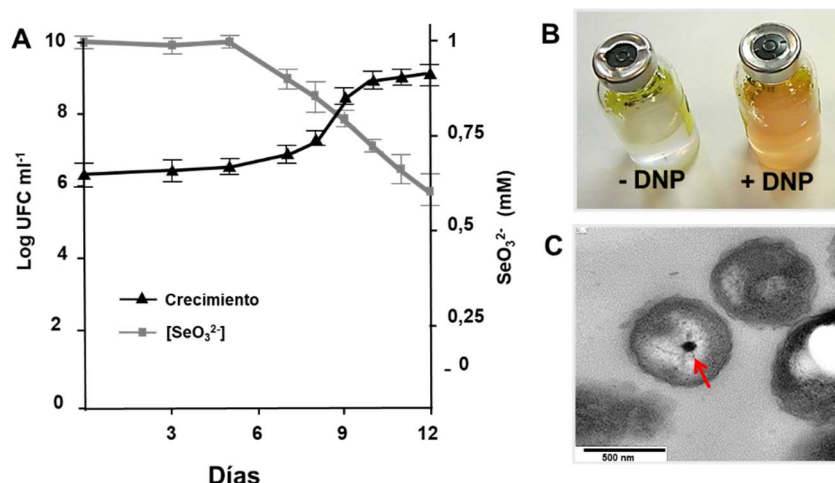


Figura 44. Reducción de selenito por *Azoarcus* sp. CIB creciendo en presencia de DNP. A) Curva de crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) suplementado con selenito (1 mM) y DNP (40mg/l) y la cinética de reducción de selenito en esas mismas condiciones. Los resultados representados son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. **B)** Viales anaeróbicos de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB sin DNP (-DNP) o suplementado con 40 mg/l de DNP (+DNP) recogidos en sus fases de crecimiento exponencial, i.e., 24 h y 7 días, respectivamente. **C)** Imagen de TEM de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB suplementados con DNP y recogidos durante la fase exponencial (7 días). La flecha roja indica la presencia de SeNP en el citoplasma de la célula.

El conjunto de resultados mostrados anteriormente avala la hipótesis sobre la existencia de un mecanismo molecular de resistencia anaeróbica al selenito que es dependiente de energía y, por tanto, principalmente activo durante la fase exponencial de crecimiento, y que probablemente consista en la secreción de este oxianión al medio de cultivo.

9.1.3.- Sistemas alternativos de producción de SeNPs basados en *Azoarcus* sp. CIB

Los resultados anteriores han demostrado la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB de sintetizar nanopartículas de selenio. Sin embargo, para el desarrollo de una aplicación industrial resulta de gran interés la determinación de las condiciones óptimas en las que realizar la síntesis de SeNPs como, por ejemplo, presencia o ausencia de oxígeno, utilización de células en crecimiento o en reposo (*resting cell*), etc. Con el objetivo de comprobar si la reducción de selenito puede llevarse a cabo en condiciones que mejoren las probadas anteriormente (cultivos

anaeróbicos en fase estacionaria), se realizaron en primer lugar ensayos de *resting cell*, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, a partir de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos anaeróbicamente en medio MC con piruvato. Las células se recogieron a una A_{600} de 0,8 y se resuspendieron en una solución tampón suplementada con selenito 1 mM, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos. Tras 48 h de incubación a 30 °C se identificó en ambos casos el característico color naranja del selenio elemental amorfo, lo que sugería que el selenito se estaba reduciendo tanto en condiciones anóxicas como oxigenadas. Mediante TEM se pudo demostrar la presencia de nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 174 ± 36 nm en condiciones aeróbicas (Fig. 45A, B) y de 90 ± 26 nm en condiciones anaeróbicas (Fig. 45C, D), mostrando estas últimas un tamaño similar al de las nanopartículas producidas con cultivos anaeróbicos (Fig. 42E).

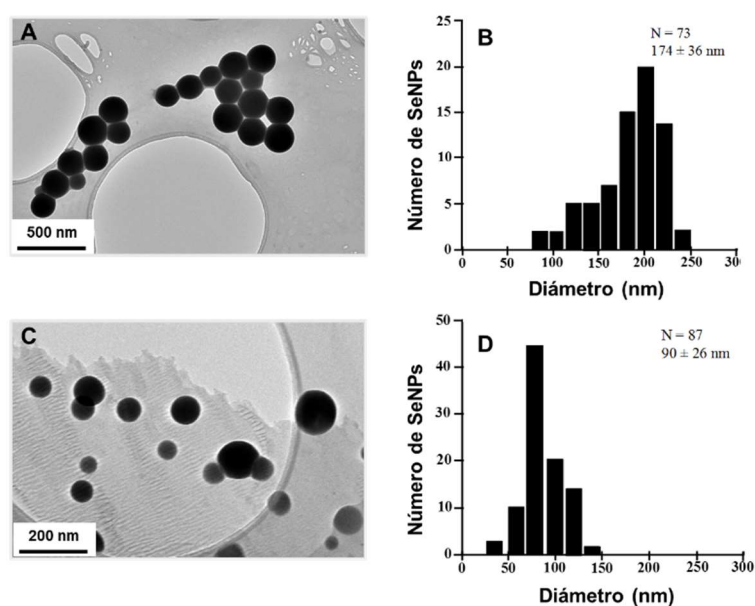


Figura 45. Producción de SeNPs en *resting cells* de *Azoarcus* sp. CIB. Se cultivó *Azoarcus* sp. CIB anaeróbicamente en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento. Las células se resuspendieron (*resting cell*) en tampón HEPES (50mM, pH 7,5) y se dividieron en dos alícuotas a las que se añadió selenito 1 mM. Una de las alícuotas se incubó a 30°C durante 48 h en presencia de oxígeno (condiciones aeróbicas) y la otra se incubó el mismo tiempo en ausencia de oxígeno (condiciones anaeróbicas). Se muestran imágenes de TEM (A y C) y de la distribución del tamaño (B y D) de las SeNPs sintetizadas por *Azoarcus* sp. CIB en condiciones de aeróbicas (A y B) o anaeróbicas (C y D).

Estos resultados sugieren que el mecanismo de formación de SeNPs no necesita estar inducido por células previamente crecidas en presencia de selenito y no depende de anaerobiosis estricta. Además, estos datos demuestran que el proceso de biosíntesis de SeNPs puede ser implementado como un proceso de *resting cells* usando la bacteria *Azoarcus* sp. CIB como biocatalizador. Una de sus ventajas estriba en que puede producirse primero una gran biomasa celular en ausencia de selenito, evitando su efecto tóxico sobre el crecimiento celular, añadiéndose posteriormente el selenito para su reducción biológica a SeNPs.

En el apartado 9.1 de estos resultados se ha descrito la capacidad de formación de SeNPs a partir de extractos celulares, técnica que ya había sido implementada previamente para la producción de SeNPs a partir de extractos libres de células de bacterias y plantas (Li *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2012). Con el objetivo de determinar si existe producción de SeNPs a partir de un sistema libre de células derivado de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB, se añadió selenito 1 mM a un extracto celular obtenido por sonicación, y se incubó aeróbicamente durante 24 h a 30 °C. Tras la incubación, se obtuvo una solución con el típico color naranja asociado a la reducción del selenito, observándose mediante TEM la presencia de nanopartículas (Fig. 46A) de un diámetro medio de 141 nm \pm 37 nm (Fig. 46B) que por EDX se confirmó que estaban compuestas por selenio (Fig. 46C). Estos resultados indicaban que las SeNPs también se pueden obtener utilizando extractos de *Azoarcus* sp. CIB. Para comparar las SeNPs sintetizadas mediante esta técnica libre de células con las nanopartículas que se generan químicamente, se procedió a sintetizar SeNPs a partir de selenito en presencia de glutatión como catalizador, siguiendo el protocolo desarrollado por Ramos y Webster (2012) y detallado en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos. Con este método, se obtuvo en pocos segundos un precipitado naranja oscuro debido a la reducción instantánea del selenito a selenio. Mediante TEM se pudo comprobar que la síntesis química con glutatión producía agregados poco estructurados (Fig. 46D) cuya composición, analizada mediante EDX, era de selenio (Fig. 46E).

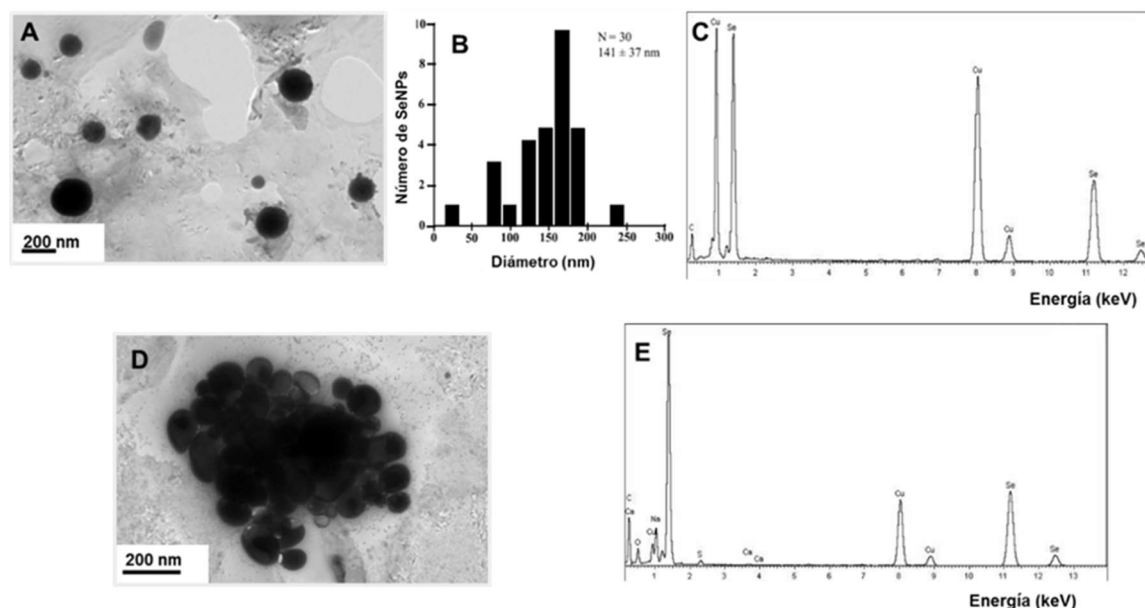


Figura 46. Producción de SeNPs utilizando extractos celulares (A-C) o síntesis química (D-E). Se obtuvieron extractos celulares de la cepa CIB siguiendo el protocolo detallado en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen de TEM de las nanopartículas sintetizadas (A), su tamaño (B) y su composición determinada mediante EDX (C) de las SeNPs. D y E) Síntesis química de SeNPs a partir de una reducción química de selenito a selenio mediada por glutatión reducido (ver apartado 7.1 de. Materiales y Métodos). Se muestra una imagen de TEM de las nanopartículas sintetizadas (D) y el análisis de su composición mediante EDX (E).

En resumen, estos resultados demuestran que la reducción de selenito y la formación de SeNPs puede también conseguirse mediante un proceso libre de células con extractos derivados de *Azoarcus* sp. CIB cultivado en condiciones aeróbicas, ofreciendo una producción de SeNPs más homogéneas y estructuradas que las derivadas de la síntesis química.

9.2.- Resistencia a telurito y formación de TeNPs por *Azoarcus* sp. CIB

El telurito es un oxianión del telurio que ha sido utilizado como antimicrobiano debido a su alta toxicidad para la mayoría de las bacterias (Ba *et al.*, 2010). Como se ha indicado en el apartado 6.2 de la Introducción, aunque se han descrito algunas bacterias resistentes, todavía se desconocen muchos aspectos relacionados con los mecanismos bacterianos de resistencia a Te^{4+} . Esto ha despertado un gran interés por el estudio de bacterias resistentes a telurito, especialmente cuando se observó que en muchos casos la resistencia a telurito

Resultados

estaba ligada a la producción de TeNPs de gran interés en campos tan dispares como la biomedicina o la electrónica (Zannoni *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2012).

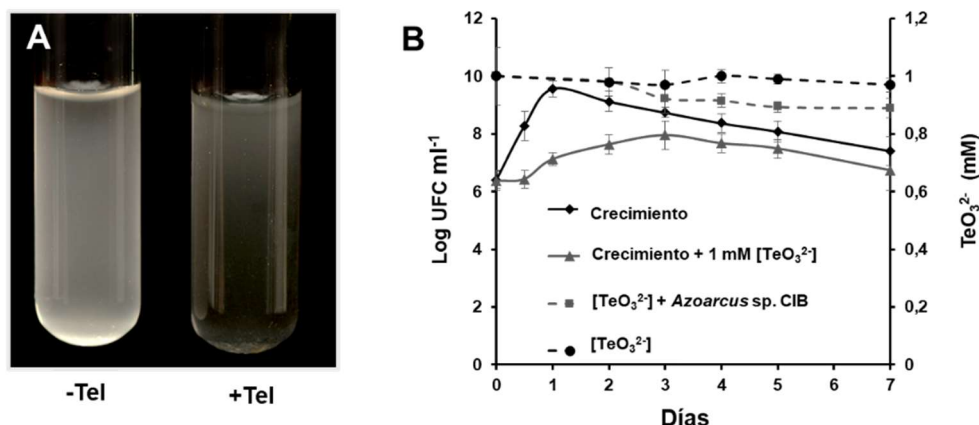


Figura 47. Crecimiento aeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en medio mínimo suplementado con telurito. A) Imágenes de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos aeróbicamente durante 7 días en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) en ausencia (-Tel) o en presencia (+Tel) de telurito 1 mM. En la imagen de la derecha se observa la intensa coloración negra debida a la reducción de telurito. **B)** Curva de crecimiento aeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC-piruvato 0,2% (m/v) en ausencia (rombos) o en presencia (triángulos) de telurito 1 mM, y cinética de reducción de telurito en ausencia (círculos) o en presencia (cuadrados) de células. Los resultados mostrados representan la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Para analizar el crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en telurito, se cultivaron aeróbica o anaeróbicamente células de CIB en medio MC suplementado con piruvato al 0,2% (m/v) y con diversas concentraciones de telurito. En condiciones aeróbicas, la MIC era de 3 mM, observándose un cambio en la tonalidad del medio hasta un negro intenso (Fig. 47). Sin embargo, en condiciones anaeróbicas la resistencia al telurito observada fue menor que en condiciones aeróbicas, ya que no se observó crecimiento a concentraciones superiores a 0,5 mM. La cinética de crecimiento de la cepa CIB se monitorizó a lo largo del tiempo en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) aeróbico suplementado con telurito 1 mM, mediante recuento de viables, observándose que el telurito resultaba moderadamente tóxico, ya que su presencia retrasó el crecimiento dos días y redujo el número de células en dos órdenes de magnitud respecto al control sin metaloide (Fig. 47B). En los cultivos crecidos en presencia de Te^{4+} el cambio de tonalidad del medio se observó a partir del tercer día, lo que sugiere que el proceso de reducción de telurito a telurito se produce en la fase estacionaria del crecimiento. Se monitorizó mediante ICP-OES la concentración de telurito que permanecía en el medio a lo

largo de la curva de crecimiento, confirmándose que el descenso en dicha concentración se produce a partir del tercer día, cuando se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, si bien dicho descenso era solo de un 10% (Fig. 47B). Este resultado sugiere que la cepa CIB puede estar utilizando un mecanismo de resistencia a telurito complementario a la reducción. En otras bacterias se ha descrito que la metilación juega un importante papel en la detoxificación del telurito. Las especies metiladas formadas son iónicas, y por ese motivo también son detectadas por la técnica de ICP, y poseen un fuerte olor a ajo. Dicho olor fue percibido en los cultivos de *Azoarcus* sp. CIB crecidos en presencia de Te^{4+} , por lo que es posible que el leve descenso en la curva de ICP no se deba a que el telurito permanece en el medio, sino a que es transformado en otras especies cargadas, los derivados metilados de telurito.

Para comprobar si la reducción de telurito a telurio llevada a cabo por cultivos de *Azoarcus* sp. CIB podría estar acoplada a la síntesis de TeNPs, se realizaron estudios de microscopía con SEM y TEM. Para ello se cultivó *Azoarcus* sp. CIB aeróbicamente a 30 °C en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) suplementado con telurito 1 mM, recuperándose las células por centrifugación cuando el medio de cultivo presentaba un tono intensamente negro (a los 7 días de incubación). La observación por TEM se realizó utilizando dos técnicas: (i) por un lado, se observaron los cultivos directamente lo que permitió confirmar la presencia de TeNPs en forma de filamentos (Fig. 48A) y, (ii) por otro lado, se realizaron inclusiones de las bacterias para la realización de microcortes (ver apartado 8.2.2 de Materiales y Métodos) que confirmaron la localización intracelular de las TeNPs (Fig. 48B). Para observar con más detalle la morfología de las TeNPs se empleó SEM. Mediante esta técnica, no se observaron TeNPs en células intactas de *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 48D), sin embargo, sí se observaron adheridas a restos de membranas celulares empleando lisados de cultivos de *Azoarcus* sp. CIB obtenidos por sonicación, confirmándose que las TeNPs poseen morfología cilíndrica (Fig. 48C). En conjunto, las observaciones de SEM y TEM sugieren que la producción de TeNPs es intracelular y su liberación sólo se produce si *Azoarcus* sp. CIB es sometido a lisis celular. El análisis elemental de las TeNPs mediante EDX confirmó la presencia de los picos de absorción característicos del telurio a la vez que aparecían otros picos de elementos como

Resultados

P, S, N y O (Fig. 48E). Esto sugeriría que dichas NPs podrían estar rodeadas de material celular de naturaleza aún no determinada. El análisis de difracción SAED confirmó que la estructura de las TeNPs es de naturaleza cristalina, como puede apreciarse en el patrón de difracción (imagen de la esquina superior derecha de la figura 48E) en el que se observan puntos de refracción nítidos correspondientes a cada plano del cristal.

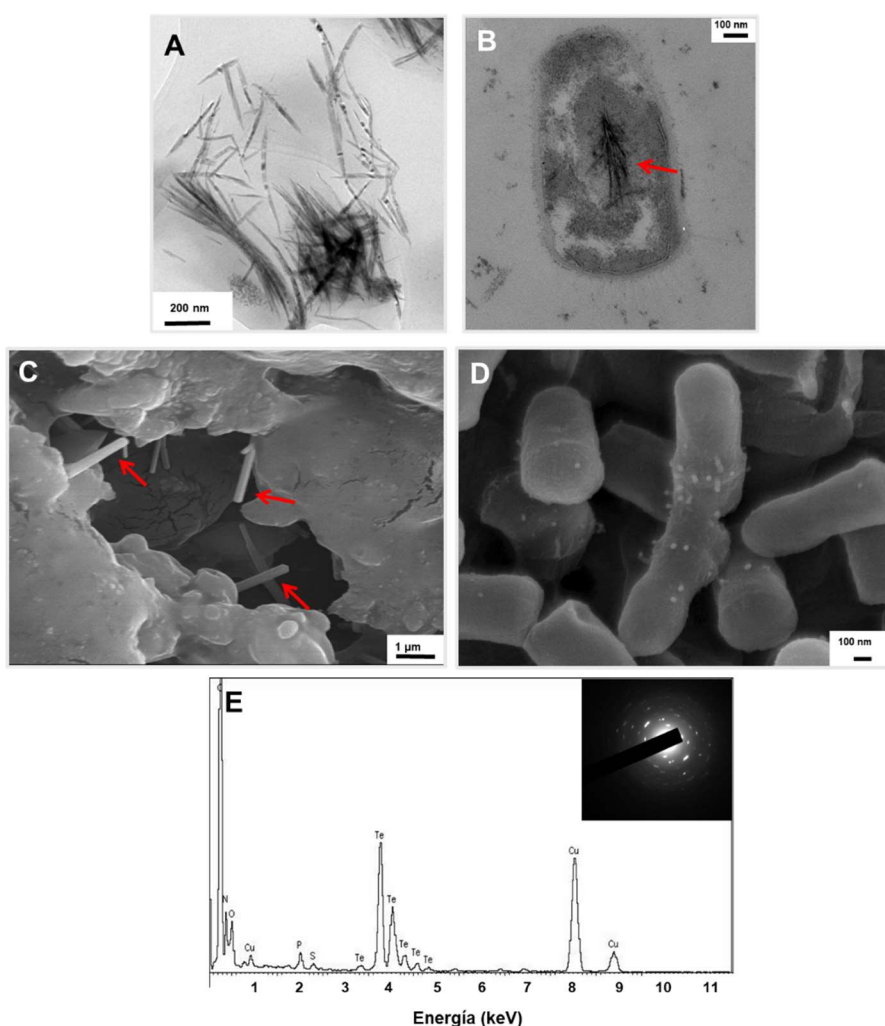


Figura 48. Caracterización de nanopartículas de teluro producidas por *Azoarcus* sp. CIB. A) Imagen de TEM de TeNPs liberadas tras lisis celular. **B)** Imagen de TEM de una sección longitudinal de una célula de *Azoarcus* sp. CIB con TeNPs (flecha roja) en su interior. **C)** Imagen de SEM de TeNPs (flechas rojas) adheridas, tras la lisis celular, a restos de membranas celulares. **D)** Imagen de SEM de células de *Azoarcus* sp. CIB intactas en las que no se observan TeNPs. **E)** Espectro del análisis EDX de una TeNP del panel A, la esquina superior derecha se muestra el análisis de difracción SAED que confirma la naturaleza cristalina de las NPs al observarse los puntos de difracción nítidos correspondientes a cada plano del cristal.

10.- Identificación y estudio de los *clusters* génicos relacionados con la resistencia a arsénico en *Azoarcus* sp. CIB

Durante los ensayos de resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a diferentes metales y metaloides llamó especialmente la atención la gran tolerancia que la cepa mostró hacia diferentes especies de arsénico, ya que CIB fue capaz de crecer tanto aeróbica como anaeróbicamente concentraciones de arseniato mayores de 100 mM, y hasta 1 mM de arsenito (aeróbico) y 0,5 mM (anaeróbico) (Tabla 10). Como se ha indicado en la Introducción, se han identificado y estudiado diferentes sistemas de resistencia a especies de arsénico en multitud de bacterias, agrupándose los genes responsables en diferentes *clusters* como los *ars*, *arr*, *aio* y *arx* (Amend *et al.*, 2014). En el genoma de *Azoarcus* sp. CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015) se han identificado algunos genes ortólogos a aquellos que han sido relacionados en otros microorganismos con la resistencia/utilización de especies de arsénico. En los siguientes apartados pasan a detallarse tales genes, así como su organización en la cepa CIB.

10.1.- Resistencia a arseniato: genes *ars*

La agrupación génica relacionada con la resistencia a arseniato y a especies metiladas de arsénico es el *cluster ars* (Amend *et al.*, 2014). Como se ha desarrollado en el apartado 7.1 de la Introducción, este *cluster* se encuentra ampliamente distribuido en todo el dominio Bacteria, habiéndose localizado tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano. Además, la organización génica del *cluster ars* posee una gran variación entre cepas, tanto como su organización, composición como por el copias del operón (Páez-Espino *et al.*, 2009; Andres y Bertin, 2016).

En *Azoarcus* sp. CIB se ha identificado un único *cluster ars* (*arsRCDAB*, AzCIB_1124-AzCIB_1128) (Fig. 49), así como un gen (*arsC2*, AzCIB_3861) que podría codificar una segunda arseniato reductasa y que está localizado fuera del *cluster ars*. Por el contrario, no se ha identificado ningún gen *ars* relacionado con la metilación y volatilización de compuestos arsenicales.

Cuando se utilizó *cluster ars* de la cepa CIB para identificar *clusters* ortólogos en los genomas disponibles de otras bacterias del género *Azoarcus* (y

Resultados

de las que no existe ningún dato experimental sobre su posible resistencia a arsénico), se observó que las cepas degradadoras de compuestos aromáticos, e.g., CIB, KH32C, EbN1, poseen un *cluster ars* diferente al de las cepas que presentan una marcada interacción con planta, e.g., BH72, DQS-4 (Fig. 49).

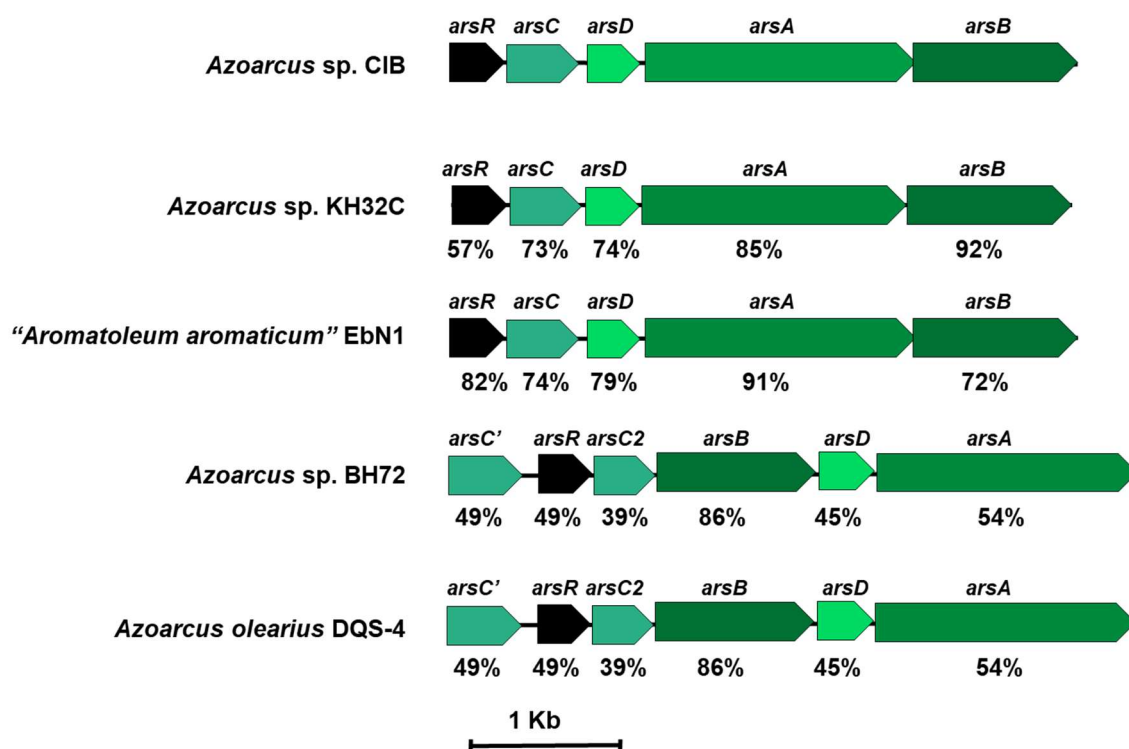


Figura 49. Comparación del *cluster ars* en diferentes cepas del género *Azoarcus*. Se muestra, en la parte superior, el nombre asignado a cada gen y, en la parte inferior, el porcentaje de identidad de cada gen respecto a su ortólogo en la cepa *Azoarcus* sp. CIB.

Como se ha indicado en la Introducción, las enzimas arseniato reductasas, ArsC, se clasifican principalmente en dos familias según el tipo de enzima secundaria que participe como donador de electrones en la reacción de reducción, i.e., tiorredoxinas o glutarredoxinas. Un análisis filogenético de las enzimas ArsC codificadas en los *clusters ars* del género *Azoarcus* muestra su pertenencia a la familia de las arseniato reductasas dependientes de tiorredoxinas (Fig. 50). En el caso específico de *Azoarcus* sp. CIB, la enzima ArsC del *cluster arsRCDAB* está muy relacionada filogenéticamente con la enzima ArsC de "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1 (Fig. 50). Sin embargo, el análisis filogenético de la arseniato

reductasa ArsC2 de CIB sugiere su inclusión en la familia de las arseniato reductasas dependientes de glutarredoxinas (Fig. 50).

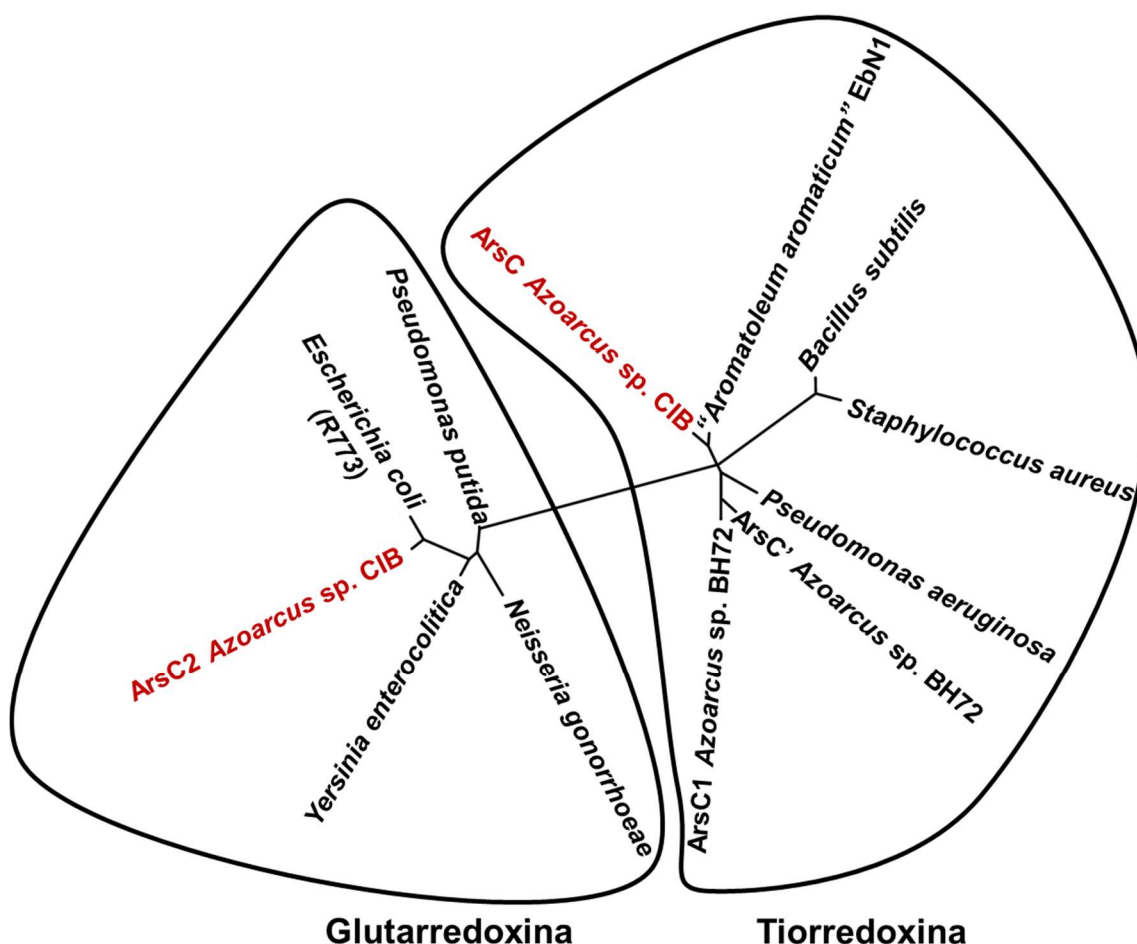


Figura 50. Filograma de la enzima ArsC. El análisis filogenético de las proteínas ArsC de varias bacterias modelo muestra su distribución en dos clados principales, coincidentes con las dos familias de arseniato reductasas (dependientes de glutarredoxinas o tiorredoxinas). *Azoarcus* sp. CIB posee dos arseniato reductasas (rojo), una perteneciente a la familia tiorredoxina-dependiente, codificada por el gen *arsC*, y otra perteneciente a la familia de las glutarredoxina-dependientes, codificada por el gen *arsC2*. A continuación, se detallan los números de acceso de las proteínas analizadas: *Azoarcus* sp. CIB (ArsC: AKU11030.1; ArsC2: AKU13754.1), “*A. aromaticum*” EbN1 (WP_011238646.1), *B. subtilis* (AGG61979.1), *S. aureus* (AAP32350.1), *P. aeruginosa* AAC69644.1, *Azoarcus* sp. BH72 (ArsC1: CAL94968.1; ArsC’: CAL94970.1), *P. putida* (AAN67266.1), *E. coli* (EGT69533.1), *Y. enterocolitica* (AJJ21866.1), *N. gonorrhoeae* (ACF30932.1)

Para confirmar en *Azoarcus* sp. CIB la capacidad de resistencia a arseniato y el papel de los genes descritos anteriormente, se construyeron tres cepas mutantes por inserción en los genes (Tabla 11): (i) *arsC*, codifica una posible

Resultados

arseniato reductasa dependiente de tiorredoxina del *cluster arsRCDAB*, obteniéndose la cepa *Azoarcus* sp. CIBdarsC; (ii) *arsB*, codifica una posible bomba de extrusión de arsenito del *cluster arsRCDAB*, obteniéndose la cepa *Azoarcus* sp. CIBdarsB; (iii) *arsC2*, codifica una posible arseniato reductasa dependiente de glutarredoxina, obteniéndose la cepa *Azoarcus* sp. CIBdarsC2. Las cepas mutantes se obtuvieron mediante recombinación homóloga de los fragmentos internos de los genes diana clonados en el plásmido pK18*mob*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de diferentes cepas de *Azoarcus* sp. CIB a arseniato en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) en condiciones aeróbicas (+O₂) o anaeróbicas (-O₂)

Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (mM)	
	+O ₂	-O ₂
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	150	150
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdarsB	25	25
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdarsC	100	100
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdarsC2	75	75

Una vez obtenidas las cepas mutantes, se analizó su resistencia al arseniato mediante la monitorización del crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de este compuesto tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Así, se pudo confirmar que todas las cepas mutantes ven mermada su capacidad de resistencia respecto a la cepa parental, especialmente a partir de concentraciones altas (más de 50 mM), no observándose en ninguna de ellas crecimiento a una concentración de arseniato superior a 100 mM (Fig. 51). La MIC al arseniato para cada cepa, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, se resume en la Tabla 11.

El hecho de que las cepas mutantes en las arseniato reductasas *arsC* y *arsC2* sigan siendo capaces de crecer en presencia de concentraciones moderadas de arseniato (10 mM) hasta una A_{600} de 1 en condiciones aeróbicas (Fig. 51A) y 0,8 en condiciones anaeróbicas (Fig. 51B), podría indicar un efecto sinérgico entre ambos genes durante la detoxificación del arseniato. Por otro lado,

la cepa mutante en el gen *arsB* fue más sensible, especialmente en condiciones aeróbicas, desde concentraciones moderadas de arseniato (10 mM) que los mutantes en las arseniato reductasas, lo cual sugiere la importancia de la extrusión durante la detoxificación de los oxianiones de arsénico.

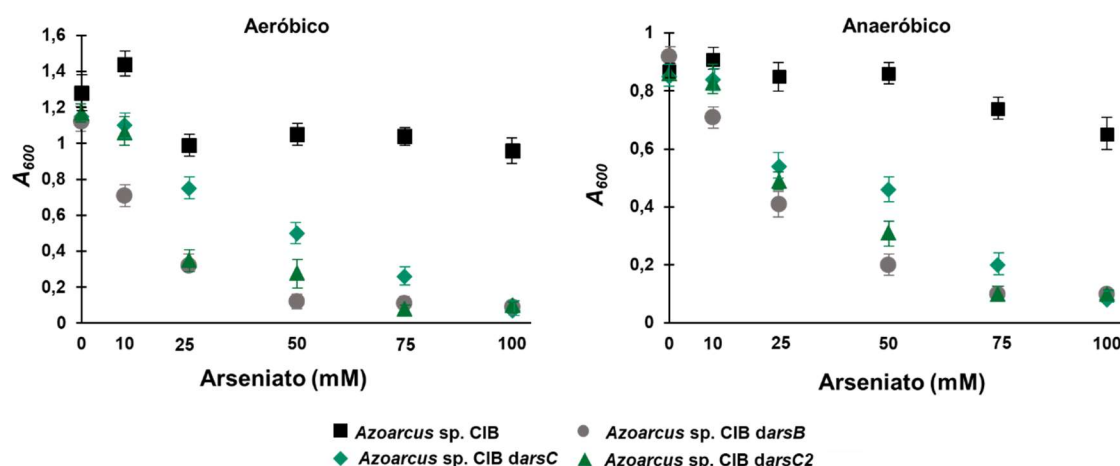


Figura 51. Resistencia de diferentes cepas de *Azoarcus* sp. CIB a arseniato. Se presenta el crecimiento observado a las 48 horas de incubación en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v) suplementado con concentraciones crecientes de arseniato (desde 0 a 100 mM) de *Azoarcus* sp. CIB y las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIB *darsC*, *Azoarcus* sp. CIB *darsB* y *Azoarcus* sp. CIB *darsC2* en condiciones aeróbicas (A) o anaeróbicas (B). Los resultados mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Los resultados anteriores confirman que tanto el *cluster arsRCDAB* como el gen *arsC2* están implicados en la resistencia aeróbica y anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a arseniato. Con el objetivo de comprobar si los genes del *cluster arsRCDAB* y *arsC2* se inducían por la presencia de formas iónicas del arsénico, se analizó la expresión génica del gen *arsC* y *arsC2* mediante experimentos de RT-PCR cuantitativa. Para ello, se extrajo RNA de células de *Azoarcus* sp. CIB crecidas en medio MC con piruvato al 0,2% (m/v), en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, en presencia de arseniato 10 mM o arsenito 1 mM, así como de células control crecidas en las mismas condiciones sin oxianiones de arsénico. Como puede observarse en la figura 52, el gen *arsC* se ve fuertemente inducido por arseniato y arsenito tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que está de acuerdo con el papel del *cluster ars* en la resistencia al arseniato. El gen *arsC2* parece tener expresión constitutiva en *Azoarcus* sp. CIB (el valor Ct obtenido para todas las condiciones estudiadas, en ausencia de especies de

Resultados

arsénico, fue similar al valor del gen constitutivo "house-keeping" *dnaE*) y tan sólo se observa una mayor inducción mediada por arseniato en condiciones aeróbicas. Paradójicamente, la presencia de arsenito en el medio reprime fuertemente la expresión de *arsC2* en condiciones aeróbicas (Fig. 52).

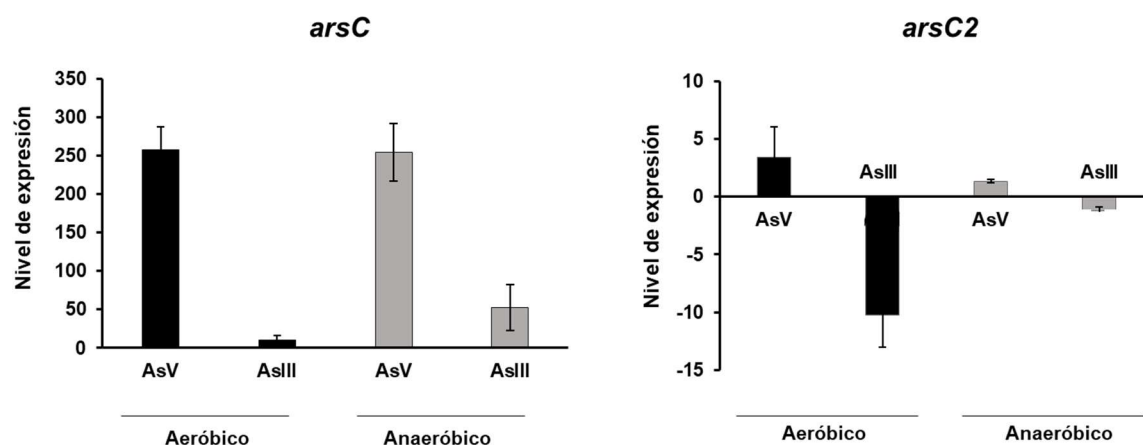


Figura 52. Expresión de los genes *arsC* y *arsC2* en presencia de arseniato y arsenito en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las células de *Azoarcus* sp. CIB se crecieron en presencia de arseniato o arsenito en condiciones aeróbicas (negro) o anaeróbicas (gris). Tras la extracción y procesamiento del RNA total, se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión de los genes *arsC* y *arsC2*, tal y como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La expresión de los genes se relativizó, según el método $\Delta\Delta C_t$, a la de las células crecidas en las mismas condiciones sin arseniato ni arsenito, utilizándose como control interno la expresión del gen constitutivo *dnaE*. Se indica el valor medio y la desviación estándar correspondiente a los resultados de tres experimentos independientes.

10.2 Resistencia a arsenito: el *cluster arx*

El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB permitió identificar una agrupación génica (AzCIB_1144-AzCIB_1151) cercana a los genes *ars* y similar a un *cluster arx* de resistencia a arsenito. Como se indica en la Introducción, el *cluster arx* está relacionado con la oxidación de arsenito a arseniato como fuente de energía en condiciones anaeróbicas (Oremland *et al.*, 2017). Este *cluster* permite un estilo de vida autótrofo y tan solo se ha identificado hasta ahora en microorganismos que son capaces de fijar carbono y colonizar hábitats con elevada concentración de arsénico (Hernandez-Maldonado *et al.*, 2017). Por ello, el estudio y funcionalidad del *cluster arx* en la cepa heterótrofa *Azoarcus* sp. CIB era de especial interés. Un *cluster* similar se ha identificado también en esta tesis

en el genoma recientemente secuenciado de la cepa *Azoarcus tolulyticus* Tol-4 (Fig. 53).

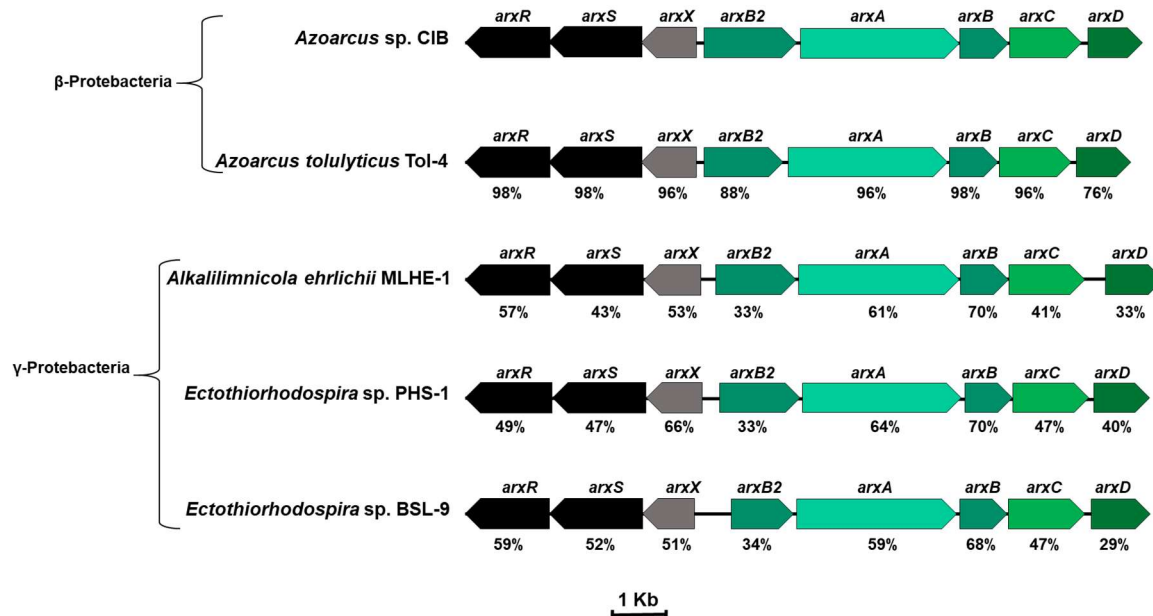


Figura 53. Comparación del cluster *arx* en diferentes cepas bacterianas. Se presenta la organización del cluster *arx* en las cepas *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1, *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1, *Ectothiorhodospira* sp. BSL-9, *Azoarcus tolulyticus* Tol-4 y *Azoarcus* sp. CIB. En el diagrama se muestra, en la parte superior, el nombre asignado a cada gen y, en la parte inferior, el porcentaje de identidad de cada uno respecto a su ortólogo en la cepa *Azoarcus* sp. CIB.

El cluster *arx* de la cepa CIB está formado por 8 genes que se organizan en dos posibles operones divergentes: (i) los genes *arxXSR*, presumiblemente implicados en regulación y que codifican, respectivamente, para una proteína periplásmica de unión a arsenito y para un sistema regulador de dos componentes; y (ii) los genes *arxB2ABCD*, que constituyen los genes estructurales y auxiliares del complejo arsenito oxidasa y que codifican la subunidad pequeña de la arsenito oxidasa (*arxB2* y *arxB*), la subunidad mayor de esta enzima (*arxA*), una proteína de membrana que interviene en la transferencia de electrones (*arxC*) y una chaperona citoplasmática (*arxD*). La organización del cluster *arx* se mantiene muy conservada en las diferentes bacterias en las que se ha identificado, y los genes estructurales que codifican la arsenito oxidasa, *arxA* y *arxB*, están altamente conservados en todas las cepas (Fig. 53).

Para comprobar la implicación de los genes *arx* con el metabolismo del arsenito se construyó una cepa mutante por inserción en el gen *arxA*, *Azoarcus*

Resultados

sp. CIBdarxA (Tabla. 4). Dicha cepa veía fuertemente comprometida su capacidad de crecer en presencia de arsenito, no siendo capaz de resistir concentraciones superiores a 0,2 mM en medio MC piruvato al 0,2% (m/v) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Hasta ahora, se había descrito que las arsenito oxidasas anaeróbicas aportan una fuente adicional de energía que permitiría a sus portadores llevar un estilo de vida autótrofo. Sin embargo, *Azoarcus* sp. CIB no posee la capacidad de fijar carbono, por lo que cabría plantearse si la oxidación del arsenito también podría suponer una ventaja adaptativa incluso en condiciones de heterotrofía. Para comprobar esta hipótesis, se cultivó a *Azoarcus* sp. CIB anaeróticamente en condiciones subóptimas de fuente de carbono, *i.e.*, medio MC suplementado con piruvato al 0,1% o medio MC suplementado con benzoato 3 mM, pudiéndose observar en los cultivos suplementados con arsenito (1mM) un mayor crecimiento celular a lo largo de la curva de crecimiento respecto al control sin arsenito (Fig. 54).

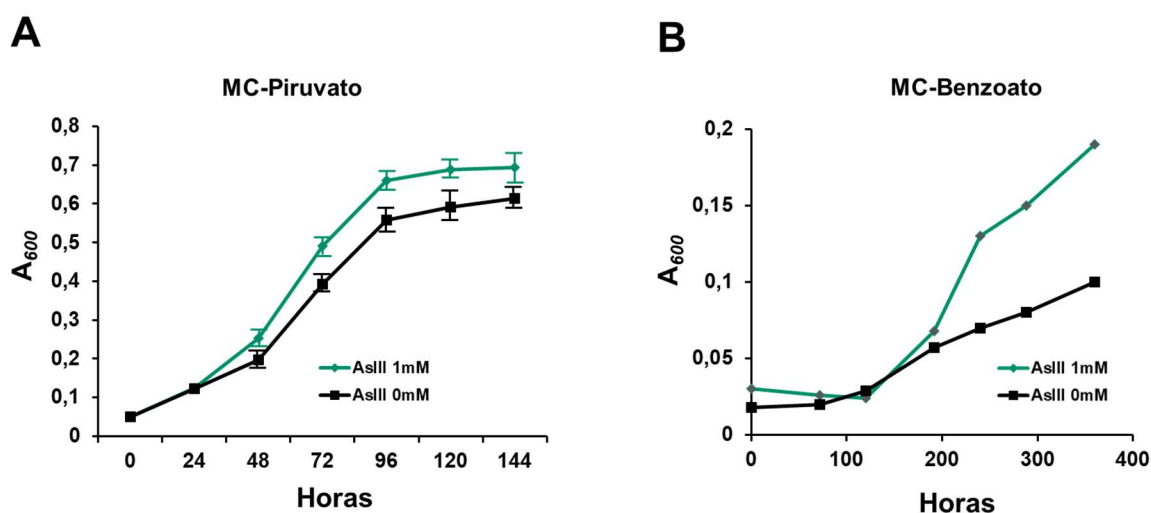


Figura 54. Efecto energizante del arsenito en cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB. A) Curvas de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con piruvato al 0,1% (m/v) suplementado con arsenito (1 mM) o sin arsenito (0 mM). **B)** Curvas de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en medio MC con benzoato 3 mM suplementado con arsenito (1 mM) o sin arsenito (0 mM).

Los resultados obtenidos revelan por primera vez que *Azoarcus* sp. CIB, aun siendo un organismo heterótrofo, es capaz de utilizar un compuesto inorgánico como el arsenito como fuente de energía.

Para estudiar si la expresión del gen *arxA* se ve influenciada por la presencia de arsénico en el medio de cultivo se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa a partir de RNA total procedente de células de *Azoarcus* sp. CIB crecidas aeróbica o anaeróbicamente con o sin arseniato (10 mM) o arsenito (1 mM). Pudo observarse que, si bien la expresión del gen *arxA* apenas se ve modificada por la presencia de arseniato en el medio, sí responde a la presencia de arsenito (Fig. 55). Así, en presencia de arsenito la expresión de *arxA* mostró una fuerte inducción en condiciones anaeróbicas, mientras que su expresión se vio reprimida en torno a 2 veces en presencia de oxígeno (Fig.55).

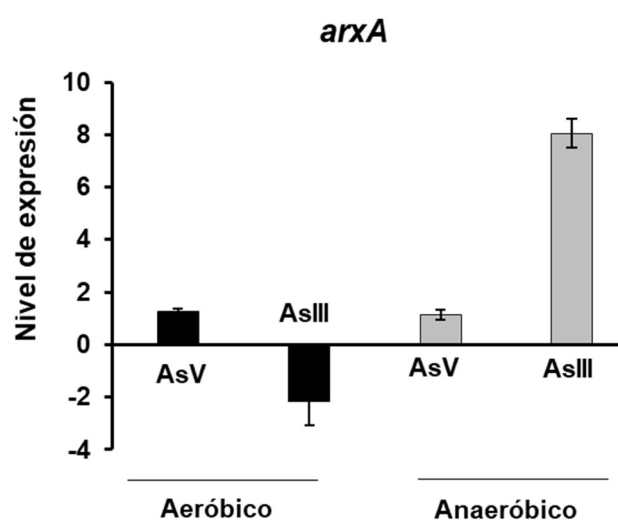


Figura 55. Expresión del gen *arxA* en *Azoarcus* sp. CIB. Las células de *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron en medio MC piruvato al 0,2% (m/v) en presencia de arseniato (AsV) o arsenito (AsIII) en condiciones aeróbicas (negro) o anaeróbicas (gris). Tras la extracción y procesamiento del RNA total, se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión del gen *arxA*, tal y como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La expresión de los genes se relativizó, según el método $\Delta\Delta C_t$, a la de las células cultivadas en las mismas condiciones sin arsenito, utilizándose como control interno la expresión del gen constitutivo *dnaE*. Se indica el valor medio y la desviación estándar correspondiente a los resultados de tres experimentos independientes

En resumen, todos estos resultados confirman la implicación del cluster *arx* en la energización anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB cuando se cultiva en presencia de arsenito.

VII. ANEXO I

TABLA S1. Genes diferencialmente expresados (DEGs), i.e., inducidos (rojo) y reprimidos (verde) en la cepa *Azoarcus* sp. CIB cultivada en presencia de extractos de raíz de arroz.

Gen	Función asignada	Categoría COG	Fold Change	Probabilidad
AzCIB_4715	Proteína periplásmica de un transportador de ácidos tricarboxílicos, TctC	S	760,51	0,995
AzCIB_4714	Proteína de membrana de un transportador de ácidos tricarboxílicos, TctB		354,40	0,995
AzCIB_4716	Proteína periplásmica de un transportador de ácidos tricarboxílicos, TctC	S	342,53	0,999
AzCIB_4712	Proteína universal de estrés F	T	274,19	0,981
AzCIB_4713	Proteína de membrana de un transportador de ácidos tricarboxílicos, TctA	S	238,20	0,991
AzCIB_2311	NAD(P)H quinona oxidoreductasa	C,R	93,50	0,975
AzCIB_2319	Siquimato 5-deshidrogenasa	E	69,20	0,989
AzCIB_2312	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	58,35	0,989
AzCIB_1320	Óxido nítrico reductasa subunidad C, NorC	C	54,76	0,986
AzCIB_0819	Proteína putativa de exportación de polisacárido	D	51,50	0,938
AzCIB_2916	Acetil-CoA acetiltransferasa	I	50,44	0,977
AzCIB_2733	Receptor extracelular de unión a ligando	E	49,50	0,984
AzCIB_2732	Ferulil-CoA sintasa	I,Q,R	48,51	0,975
AzCIB_2313	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, permeasa		47,53	0,991
AzCIB_2176	Proteína hipotética AZKH_2418	S	46,66	0,979
AzCIB_0357	Beta-alanina-piruvato transaminasa	H	46,34	0,992
AzCIB_0823	Serina O-acetiltransferasa	E	42,84	0,925
AzCIB_3753	Permeasa del sistema de transporte de C4-dicarboxilato, subunidad pequeña	G	42,43	0,996
AzCIB_4720	Porina	M	42,33	0,994
AzCIB_1318	Subunidad adicional de la óxido nítrico reductasa, NorE	C	42,31	0,978
AzCIB_2310	3-cetoacil-(proteína portadora de grupo acilo) reductasa	I,Q,R	40,90	0,962
AzCIB_2320	Aldehído deshidrogenasa, Bphyt_5803	C	39,61	0,987
AzCIB_2318	Proteína con dominio oxidasa de unión a FAD	C	39,32	0,988
AzCIB_0818	Proteína putativa de biosíntesis de exopolisacárido	M	38,51	0,930
AzCIB_2731	Enoil-CoA hidratasa	I	37,84	0,957
AzCIB_2730	Beta-cetotiolasa	I	35,61	0,956
AzCIB_0824	Proteína de la familia glicosiltransferasa	M	34,96	0,923
AzCIB_2917	Acil-CoA transferasa familia CAIB/BAIF	C	32,64	0,972
AzCIB_2315	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión periplásmica	E	31,65	0,996

Anexo I

AzCIB_2915	3-hidroxiubutiril-CoA deshidrogenasa	I	31,56	0,969
AzCIB_2880	Aldehido ferredoxina oxidoreductasa, subunidad de tungsteno	C,H	31,47	0,963
AzCIB_2314	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, permeasa	E	30,78	0,992
AzCIB_0356	Metilmalonato-semialdehido deshidrogenasa	C	30,40	0,994
AzCIB_0822	Proteína hipotética AZKH_0943		29,67	0,913
AzCIB_0315	Proteína hipotética EbA3532	S	28,86	0,969
AzCIB_0383	Proteína integral de membrana de la familia TerC	P	28,66	0,993
AzCIB_2911	Transporte ácido aromático/protón de la familia MFS	G	25,28	0,984
AzCIB_3752	Permeasa del sistema de transporte de C4-dicarboxilato, subunidad grande	G	25,01	0,993
AzCIB_2729	3-hidroxiadipil-CoA deshidrogenasa	I,Q,R	24,11	0,932
AzCIB_2309	Porfobilinógeno sintasa	H	23,81	0,960
AzCIB_0821	Proteína hipotética AZKH_0942		23,63	0,822
AzCIB_4205	Acetil-CoA C-acetil transferasa	I	23,45	0,987
AzCIB_0817	Proteína putativa de exportación de polisacárido	M	22,94	0,932
AzCIB_4204	Complejo de oxidación de ácidos grasos, subunidad alfa	I	22,85	0,985
AzCIB_3754	Proteína periplásmica de unión a C4-dicarboxilato	G	22,09	0,996
AzCIB_0825	Proteína de la familia glicosiltransferasa	M	22,07	0,828
AzCIB_2912	Acil-CoA deshidrogenasa	I	21,02	0,985
AzCIB_1592	Proteína hipotética EbA6073	C	20,50	0,929
AzCIB_4719	Proteína extracelular de unión a sustrato, transportador ABC	P	19,59	0,975
AzCIB_0820	Proteína de la familia glicosiltransferasa	M	18,57	0,939
AzCIB_0826	Glicosil transferasa, familia WecB/TagA/CpsF	M	18,34	0,835
AzCIB_2317	Glucosa-metanol-colina oxidoreductasa	E	18,10	0,979
AzCIB_2910	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta	C	15,81	0,844
AzCIB_2914	Enoil-CoA hidratasa	I	15,20	0,963
AzCIB_0444	Transportador sodio/dicarboxilato	C	14,06	0,939
AzCIB_0382	Proteína de estrés universal, UspA	T	14,05	0,975
AzCIB_2307	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta		13,80	0,844
AzCIB_2698	Proteína hipotética AZKH_2171		13,79	0,922
AzCIB_1317	Proteína hipotética EbB7		13,48	0,889
AzCIB_1204	Proteína de complejo de transporte de electrones, RnfC	C	13,48	0,807
AzCIB_3435	Hidroxipiruvato reductasa	G	13,47	0,910
AzCIB_3607	Uroporfirinógeno III metilasa	H	12,95	0,918
AzCIB_3597	Biosíntesis de cofactor hemo d1, NirF	R	12,68	0,894
AzCIB_0231	Proteína de tipo ferredoxina NapF	C	12,67	0,967

AzCIB_0889	Transportador tripartito independiente de ATP de unión periplásmica a soluto, DctP	G,Q	12,20	0,982
AzCIB_3433	Proteína hipotética HMPREF9021_00378		11,41	0,987
AzCIB_4202	Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga	I	11,34	0,981
AzCIB_1189	Proteína del sistema de eflujo RND, lipoproteína de membrana externa	M,U	11,29	0,895
AzCIB_2913	Regulador transcripcional	K	10,82	0,971
AzCIB_0888	Transportador tripartito periplásmico ATP-independiente DctQ	G,Q	10,69	0,947
AzCIB_3395	Transportador ABC de glutamato/aspartato, proteína periplásmica de unión a glutamato/aspartato	E,T	10,23	0,976
AzCIB_3606	Proteína hipotética AZKH_3546	C	10,20	0,932
AzCIB_2883	Sistema de eflujo RND, componente periplásmico	M	10,18	0,975
AzCIB_4665	Proteína putativa de fago	R	10,17	0,848
AzCIB_1205	Proteína de complejo de transporte de electrones, RnfB	C	10,13	0,825
AzCIB_2856	2-oxoglutarato ferredoxina oxidoreductasa, subunidad alfa	C	10,09	0,802
AzCIB_4201	Fusión de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa	I	10,05	0,967
AzCIB_4200	Acetil-CoA acetiltransferasa	I	9,89	0,957
AzCIB_4206	Acil-CoA deshidrogenasa	I	9,77	0,978
AzCIB_1567	Proteína hipotética Tmz1t_2463		9,67	0,824
AzCIB_4440	Proteína putativa poliprenil sintasa	H	9,63	0,903
AzCIB_1319	Óxido nítrico reductasa subunidad B, NorB	P	9,58	0,951
AzCIB_4661	Proteína putativa de fago	R	9,56	0,913
AzCIB_4441	Proteína de tipo patatina	R	9,50	0,935
AzCIB_1283	Transportador sodio/alanina	E	9,50	0,859
AzCIB_2441	Proteína putativa ferredoxina DitA3b	C	8,97	0,812
AzCIB_4662	Proteína putativa de fago		8,70	0,906
AzCIB_4666	Proteína putativa de fago	S	8,58	0,845
AzCIB_3436	Proteína hipotética NH8B_0251	R	8,57	0,887
AzCIB_3393	Transportador ABC de glutamato/aspartato, componente de membrana	E	8,49	0,956
AzCIB_4663	Proteína putativa de fago		8,40	0,876
AzCIB_2881	Sistema de eflujo RND, lipoproteína de membrana externa	M,U	8,39	0,967
AzCIB_4667	Proteína hipotética AzKH_4557		8,38	0,831
AzCIB_2302	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR	I,Q,R	8,01	0,952
AzCIB_1187	Proteína del sistema de eflujo RND, componente periplásmico	M	7,89	0,882
AzCIB_4600	Proteína hipotética EbA2531	E	7,81	0,942

Anexo I

AzCIB_4442	Proteína de biosíntesis de ubiquinonoa, UbiB		7,59	0,952
AzCIB_1191	Hidroxilasa de anillo aromático con dominio de unión a FAD	C	7,49	0,870
AzCIB_4659	Proteína putativa de fago	R	7,46	0,929
AzCIB_4203	Acil-CoA tioesterasa	I	7,09	0,949
AzCIB_2188	Óxido nitroso reductasa, NosZ	C	7,03	0,944
AzCIB_0030	Proteína hipotética HMPREF0380_01560		7,02	0,885
AzCIB_0920	Transductor de señal histidin quinasa	T	6,97	0,829
AzCIB_0232	Nitrato reductasa subunidad periplásmica NapD	P	6,94	0,910
AzCIB_3425	2-isopropilmalato sintasa	E	6,94	0,916
AzCIB_2882	Sistema de eflujo RND, componente de membrana interna	V	6,86	0,960
AzCIB_3072	Sulfato permeasa, superfamilia MFS	P	6,82	0,876
AzCIB_0816	Proteína hipotética AZKH_0937,Azo2243		6,79	0,934
AzCIB_2728	Acil-CoA deshidrogenasa	I	6,62	0,883
AzCIB_0355	Proteína de la familia citocromo b561	C	6,62	0,958
AzCIB_2443	Dioxigenasa DitA2B, subunidad pequeña	Q	6,58	0,872
AzCIB_2440	Proteína putativa ferredoxina reductasa de DitA, DitQ, DitU	R	6,48	0,803
AzCIB_4416	Proteína putativa de membrana		6,47	0,920
AzCIB_2442	Proteína putativa permeasa MFS	G	6,44	0,850
AzCIB_4660	Proteína putativa de fago		6,40	0,927
AzCIB_2189	Regulador transcripcional, NosR	K	6,37	0,884
AzCIB_3394	L-asparaginasa/glutaminasa periplásmica	E,J	6,33	0,957
AzCIB_4439	Glicosiltransferasa		6,31	0,885
AzCIB_1984	Proteína hipotética Azo2157		6,28	0,929
AzCIB_2908	Proteína hipotética EbA4921	M	6,18	0,911
AzCIB_0143	Proteína hipotética AZKH_1597		6,14	0,890
AzCIB_1188	Proteína del sistema de eflujo RND, componente de membrana interna	V	6,12	0,876
AzCIB_3432	Proteína hipotética AZKH_3392	R	6,09	0,965
AzCIB_3605	Biosíntesis de cofactor hemo d1, NirJ	S	6,06	0,895
AzCIB_3392	Transportador ABC de glutamato/aspartato, componente de membrana	E	5,99	0,929
AzCIB_3943	Proteína hipotética EbA3935	P	5,93	0,858
AzCIB_3184	Histidina amonio liasa	E	5,91	0,935
AzCIB_2884	Regulador transcripcional, familia TetR	K	5,91	0,950
AzCIB_1251	Proteína hipotética EbA4518		5,79	0,951
AzCIB_4414	TodA reductasa	C	5,79	0,884
AzCIB_3183	Urocanato hidratasa	E	5,74	0,930
AzCIB_4249	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	5,68	0,922

AzCIB_3177	Proteína putativa de transporte	S	5,64	0,882
AzCIB_4443	Proteína hipotética TolA_1999		5,43	0,946
AzCIB_2770	Proteína estructural	C	5,16	0,948
AzCIB_1295	NADH-flavina oxidorreductasa/NADH oxidasa	C	5,16	0,920
AzCIB_0061	Proteína hipotética AZKH_0077		5,05	0,909
AzCIB_4417	TodC	Q	5,04	0,922
AzCIB_2968	Transductor sensorial quimiotáctico	N,T	5,03	0,815
AzCIB_1104	Proteína con dominio de hierro-sulfuro, tipo CDGSH	S	4,92	0,927
AzCIB_0887	Transportador tripartito de membrana interna ATP-independiente DctM	G,Q	4,88	0,906
AzCIB_3985	Fosfodiesterasa	I	4,84	0,906
AzCIB_1666	Proteína hipotética Pnuc_1676		4,79	0,828
AzCIB_3984	Proteína de tipo pirina	R	4,75	0,908
AzCIB_3284	Proteína L33 del ribosoma 50S	J	4,64	0,919
AzCIB_2308	Proteína hemeretrina con dominio HHE de unión a catión	S	4,64	0,903
AzCIB_2853	Regulador transcripcional de la familia MarR	K	4,58	0,853
AzCIB_0921	Proteína hipotética AZKH_1044	M	4,53	0,924
AzCIB_2444	Dioxigenasa DitaA1B, subunidad grande	P,R	4,49	0,852
AzCIB_3480	Proteína hipotética		4,47	0,885
AzCIB_3283	Proteína L28 del ribosoma 50S	J	4,39	0,927
AzCIB_3226	Proteína S21 del ribosoma 30S	J	4,36	0,912
AzCIB_2885	Péptido deformilasa	J	4,32	0,840
AzCIB_4315	Proteína hipotética		4,31	0,858
AzCIB_3128	Proteína S20 del ribosoma 30S	J	4,31	0,914
AzCIB_0059	Formato deshidrogenasa, subunidad alfa	C	4,27	0,919
AzCIB_1316	Chaperona de la óxido nítrico reductasa, NorQ	R	4,25	0,808
AzCIB_2430	Proteína putativa bomba de eflujo RND periplásmica		4,24	0,888
AzCIB_2738	Regulador transcripcional, familia tetR	K	4,19	0,856
AzCIB_0985	Proteína de unión a carboxilatos, AccT	E	4,18	0,807
AzCIB_0815	Proteína hipotética AZKH_0936		4,17	0,896
AzCIB_1993	Proteína hipotética EbA6138	M	4,17	0,896
AzCIB_3096	Regulador transcripcional, familia Crp/Fnr	T	4,13	0,912
AzCIB_0360	RNA helicasa dependiente de ATP	J,K,L	4,08	0,910
AzCIB_0318	D-aminoácido deshidrogenasa	E	4,08	0,902
AzCIB_2316	Regulador transcripcional de la familia LacI	K	4,04	0,884
AzCIB_0814	Proteína hipotética AZKH_0935,azo2245		4,03	0,878
AzCIB_4220	Proteína hipotética EbA2617	R	3,99	0,829
AzCIB_2429	Proteína relacionada con ensamblaje de bomba RND	R	3,99	0,828

Anexo I

AzCIB_4436	Proteína de eflujo de membrana externa	M,U	3,89	0,825
AzCIB_0060	Formado deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	C	3,88	0,896
AzCIB_3458	Proteína hipotética AZKH_p0420		3,86	0,884
AzCIB_2768	Co-chaperona	O	3,85	0,908
AzCIB_3546	Proteína de procesamiento de rRNA 16S	J	3,84	0,889
AzCIB_1078	Arginasa	E	3,79	0,883
AzCIB_3455	Proteína de la familia Ycel	S	3,78	0,858
AzCIB_2806	Proteína de unión a metal	R	3,78	0,906
AzCIB_2769	Proteína hierro-azufre de ensamblaje IscA	S	3,78	0,907
AzCIB_2771	Cisteína desulfurasa	E	3,74	0,904
AzCIB_3547	Guanina-N(1)-metil transferasa tRNA	J	3,68	0,873
AzCIB_1232	Proteína de ribosilación de ADP J1	O	3,67	0,845
AzCIB_4738	Ribonucleasa P	J	3,65	0,837
AzCIB_3456	Proteína de la familia Chac	P	3,64	0,810
AzCIB_2491	Proteína de resistencia a hidroperóxido orgánico	O	3,55	0,862
AzCIB_4658	Proteína hipotética AZKH_4548		3,54	0,877
AzCIB_0932	Proteína L13 del ribosoma 50S	J	3,52	0,891
AzCIB_1079	Proteína hipotética Tmz1t_2556	R	3,52	0,885
AzCIB_1080	Regulador transcripcional modulador GAF específico del factor sigma 54, familia Fis	K,Q	3,45	0,850
AzCIB_0354	Proteína hipotética AZKH_0431	S	3,43	0,887
AzCIB_0848	Proteína hipotética AZKH_0973	T	3,39	0,830
AzCIB_2076	Proteína hipotética AZKH_2444	S	3,38	0,810
AzCIB_3545	Proteína S16 del ribosoma 30S	J	3,31	0,879
AzCIB_1186	Alfa/beta hidrolasa	I	3,30	0,809
AzCIB_0055	Proteína putativa de unión hierro-azufre	C	3,28	0,866
AzCIB_0381	Proteína hipotética AZKH_0466	P	3,28	0,857
AzCIB_1252	Proteína con dominio beta-lactamasa	P,R	3,26	0,857
AzCIB_3437	Piruvato quinasa	G	3,24	0,816
AzCIB_0228	Regulador transcripcional de tipo Dnr	T	3,23	0,856
AzCIB_4444	Regulador transcripcional, familia TetR	K	3,15	0,866
AzCIB_4052	Preproteína translocasa, subunidad SecE	U	3,14	0,867
AzCIB_0539	Proteína putativa oxaloacetato-glutamato aminotransferasa	E	3,12	0,857
AzCIB_2026	Regulador transcripcional de la familia AraC	K	3,10	0,831
AzCIB_3853	Proteína hipotética AZKH_3805	S	3,06	0,827
AzCIB_0526	Regulador transcripcional de la familia LysR	K	3,01	0,812
AzCIB_2624	Proteína hipotética AZKH_2249	S	2,99	0,854
AzCIB_4413	Tolueno dihidrodiol deshidrogenasa, TodD	I,Q,R	2,99	0,813
AzCIB_0233	Nitrato reductasa subunidad catalítica NapA	C	2,98	0,811
AzCIB_2767	Chaperona HscA	O	2,95	0,853

AzCIB_2931	Proteína L31 del ribosoma 50S	J	2,92	0,850
AzCIB_3391	Transportador ABC de glutamato/aspartato, proteína de unión a ATP	E	2,90	0,830
AzCIB_2805	Proteína L32 del ribosoma 50S	J	2,89	0,850
AzCIB_0062	Formato deshidrogenasa, subunidad gamma	C	2,88	0,838
AzCIB_4657	Proteína hipotética AZKH_4547		2,80	0,844
AzCIB_0558	Proteína S6 del ribosoma 30S	J	2,73	0,836
AzCIB_0598	Ribosa-fosfato difosfoquinasa	F,E	2,72	0,817
AzCIB_3339	Proteína L21 del ribosoma 50S	J	2,66	0,827
AzCIB_2177	Proteína hipotética EbA6293		2,65	0,806
AzCIB_2765	Proteína hipotética EbA6395	S	2,54	0,803
AzCIB_3467	Proteína hipotética AZKH_3151	R	22,10	0,959
AzCIB_3471	Sulfoacetaldehido acetiltransferasa	E,H	21,81	0,948
AzCIB_3474	Cobaltoquelatasa, subunidad CobS	R	20,09	0,947
AzCIB_3173	3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad alfa	I	13,22	0,965
AzCIB_4635	Regulador transcripcional, BoxR	E	12,20	0,969
AzCIB_3174	Metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad beta	I	11,89	0,954
AzCIB_1897	Proteína de shock térmico 90	O	11,74	0,917
AzCIB_4120	Acetato permeasa	R	11,03	0,964
AzCIB_1584	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	10,51	0,905
AzCIB_0429	Acetil-CoA acetiltransferasa		10,40	0,973
AzCIB_0750	Acetil-CoA sintetasa	I	10,36	0,964
AzCIB_3021	Chaperona molecular DnaK	O	9,92	0,970
AzCIB_3466	Oxidoreductasa dependiente de FAD	E	9,27	0,922
AzCIB_1585	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	8,92	0,892
AzCIB_0430	Acil-CoA deshidrogenasa	I	8,88	0,971
AzCIB_1057	Regulador transcripcional, familia AraC	K	8,85	0,895
AzCIB_2038	Acil-CoA deshidrogenasa	I	8,67	0,977
AzCIB_1075	Proteína de la familia citocromo C	C,E	8,17	0,943
AzCIB_1588	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a sustrato	E	8,14	0,969
AzCIB_4121	Proteína hipotética AZKH_4146	S	7,86	0,819
AzCIB_4080	Metilmalonil-CoA mutasa	I,E	7,84	0,937
AzCIB_4326	Citocromo C, clase I	C	7,53	0,884
AzCIB_3172	Acetil-CoA sintetasa	I,Q	7,51	0,933
AzCIB_1979	Flavoproteína de transferencia de electrones-ubiquinona oxidoreductasa	C	7,44	0,965
AzCIB_1586	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, permeasa	E	7,34	0,904
AzCIB_0333	Oxepin-CoA hidrolasa, PaaZ	C	7,21	0,931

Anexo I

AzCIB_3736	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	7,09	0,920
AzCIB_0774	Chaperonina GroEL	O	7,06	0,969
AzCIB_1059	Arginina N-succiniltransferasa	E	7,05	0,813
AzCIB_2039	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta	C	7,01	0,918
AzCIB_2981	Ribonucleotido reductasa, dependiente de coenzima B12	F	6,97	0,937
AzCIB_3473	Proteína de transporte gamma-aminobutirato dependiente de RpoS	E	6,69	0,907
AzCIB_1069	L-beta-lisina 5,6-aminomutasa, subunidad beta	R	6,61	0,866
AzCIB_1071	Proteína de escisión 3-ceto-5-aminohexanoato, Kce	S	6,55	0,872
AzCIB_2390	Proteína de respuesta a estrés	T	6,54	0,965
AzCIB_1056	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte de histidina, HisP	E	6,54	0,939
AzCIB_1587	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, permeasa	E	6,47	0,892
AzCIB_1853	Proteasa dependiente de ATP, chaperonina ClpB	O	6,43	0,931
AzCIB_1994	2,4-dienoil-CoA reductasa de unión a NADH y FMN	C,R	6,25	0,888
AzCIB_1070	3-aminobutiril-CoA amonio liasa	I	6,23	0,831
AzCIB_2281	Proteína hipotética AZKH_2002	S	6,20	0,908
AzCIB_3971	Proteína H de la ruta general de secreción	N,U	6,12	0,964
AzCIB_3729	Glu/Leu/Phe/Va deshidrogenasa	E	6,11	0,952
AzCIB_3175	Acil-CoA deshidrogenasa	I	6,10	0,909
AzCIB_3171	Glutación S transferasa	O	6,08	0,889
AzCIB_4634	3,4-deshidroadipil-CoA semialdehido deshidrogenasa, BoxD	C	6,04	0,924
AzCIB_1767	Proteína de membrana externa, OmpW	M	6,04	0,876
AzCIB_1583	Proteína hipotética AZKH_2109	R	6,01	0,868
AzCIB_4419	Regulador transcripcional, familia GntR	K	5,98	0,962
AzCIB_1019	Proteína de shock térmico Hsp20	O	5,85	0,898
AzCIB_2637	Ferredoxina-NADP reductasa	C	5,76	0,932
AzCIB_3735	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína de unión a ATP	E	5,74	0,832
AzCIB_2726	Proteína hipotética AZKH_3443		5,68	0,909
AzCIB_0117	Tetrionato reductasa, subunidad B	C	5,61	0,909
AzCIB_0428	Anhidrasa carbónica	P,R	5,61	0,937
AzCIB_1977	Proteína hipotética EbB219	Q	5,56	0,906
AzCIB_2389	Proteína hipotética HEAR2111		5,51	0,939
AzCIB_1020	Proteína de shock térmica Hsp20	O	5,41	0,889
AzCIB_0431	Enoil-CoA hidratasa	I	5,30	0,914
AzCIB_0087	ATPasa tipo F transportadora de protones, subunidad gamma	C	5,27	0,949
AzCIB_1978	Proteína de la superfamilia de las tioesterasas	R	5,24	0,907

AzCIB_0334	1,2-epoxifenilacetil-CoA isomerasa, PaaG	I	5,23	0,907
AzCIB_0089	ATP sintasa F0F1, subunidad epsilon	C	5,16	0,944
AzCIB_2040	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad alfa	C	5,03	0,930
AzCIB_1298	Hidrolasa dependiente de zinc	R	4,98	0,940
AzCIB_0432	Hidroximetilglutaril-CoA liasa	E	4,78	0,880
AzCIB_0088	ATP sintasa F0F1, subunidad beta	C	4,69	0,938
AzCIB_1780	Regulador transcripcional de la familia GntR	K	4,67	0,913
AzCIB_1727	Proteína periplásmica de unión a cobre, CusF1	S	4,65	0,842
AzCIB_3170	Acetoacetil-CoA sintetasa	I	4,61	0,896
AzCIB_3055	3-hidroxiubutiril-CoA deshidrogenasa	I	4,59	0,925
AzCIB_3838	Proteína hipotética MGP2080_05270	D	4,56	0,873
AzCIB_2055	Proteína hipotética AZKH_2758	N	4,55	0,927
AzCIB_1052	Proteína hipotética AZKH_1560		4,50	0,852
AzCIB_3483	Regulador transcripcional, familia IclR	K	4,49	0,922
AzCIB_3103	Citocromo cbb3, subunidad oxidasa III	C	4,43	0,926
AzCIB_1055	Transportador ABC de aminoácidos, subunidad de membrana interna hisM	E	4,36	0,804
AzCIB_1866	Proteína hipotética AZKH_1822	S	4,35	0,915
AzCIB_3730	Indolpiruvato ferredoxina oxidoreductasa	C	4,32	0,903
AzCIB_1867	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	C	4,32	0,923
AzCIB_4048	Proteína L10 del ribosoma 50S	J	4,15	0,922
AzCIB_1934	Proteína hipotética azo0326		4,11	0,871
AzCIB_3887	Pili quimiotaxis, PiliL	K,N,T	4,10	0,824
AzCIB_4636	Benzoil-CoA-dihidrodiol liasa, BoxC	I	4,09	0,873
AzCIB_2380	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad alfa	C	4,09	0,883
AzCIB_2273	Fasina		4,06	0,876
AzCIB_1066	Alcohol deshidrogenasa de unión a zinc	E,R	4,05	0,852
AzCIB_3105	Citocromo cbb3, subunidad oxidasa II	C	4,04	0,907
AzCIB_1169	Glicina hidroximetiltransferasa	E	4,02	0,826
AzCIB_3104	Citocromo cbb3, subunidad oxidasa	O	4,00	0,891
AzCIB_1250	Proteína putativa de transducción de señales	T	3,97	0,857
AzCIB_2056	Proteína hipotética EbA6535	S	3,96	0,881
AzCIB_0338	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa, PaaC	S	3,96	0,872
AzCIB_3294	Proteína hipotética AZKH_1209		3,95	0,898
AzCIB_0336	Fenilacetil-CoA tioesterasa, Paal	Q	3,95	0,855
AzCIB_2986	NADH deshidrogenasa, subunidad K	C	3,94	0,882
AzCIB_4047	Proteína L7/L12 del ribosoma 50S	J	3,89	0,913
AzCIB_0086	ATP sintasa F0F1, subunidad alfa	C	3,88	0,908
AzCIB_2988	NADH deshidrogenasa, subunidad I	C	3,88	0,899
AzCIB_1933	Proteína putativa fenilpiruvato descarboxilasa	G,H,R	3,87	0,896

Anexo I

AzCIB_2392	Factor de elongación transcripcional	K	3,85	0,903
AzCIB_3075	Proteína hipotética EbA7035		3,84	0,900
AzCIB_4159	Glutamato sintasa, subunidad beta	E,R	3,81	0,888
AzCIB_2987	NADH deshidrogenasa, subunidad J	C	3,80	0,875
AzCIB_3346	Proteína D de la ruta general de secreción	U	3,80	0,826
AzCIB_0765	Proteína bifuncional prolina deshidrogenasa/L-glutamato gamma-semialdehido deshidrogenasa, PutA	C,E	3,79	0,843
AzCIB_3482	Fosfato acetiltransferasa	C	3,75	0,846
AzCIB_1868	Succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	C	3,72	0,894
AzCIB_1023	Peptidasa de tipo caspasa C14, subunidad catalítica p20		3,70	0,811
AzCIB_2989	NADH deshidrogenasa, subunidad H	C	3,69	0,893
AzCIB_1172	Proteína T de escisión de glicina	E	3,66	0,825
AzCIB_3785	UDP-N-acetilmuramato-L-alanina ligasa	M	3,62	0,857
AzCIB_0340	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa, PaaA	S	3,61	0,859
AzCIB_0663	Fosforiribosil-ATP pirofosfatasa	E	3,50	0,833
AzCIB_1323	Proteína hipotética EbA175		3,49	0,868
AzCIB_0335	3-hidroxiadipil-CoA hidrogenasa, PaaH	I	3,49	0,829
AzCIB_2280	Proteína putativa asociada a transporte	R	3,47	0,819
AzCIB_3832	Glucosa-1-fosfato citidiltransferasa	J,M	3,47	0,851
AzCIB_2080	Proteína hipotética AZKH_2440	N,T	3,47	0,872
AzCIB_0491	Transportador sodio/alanina	E	3,46	0,820
AzCIB_2636	Regulador transcripcional de la familia LysR	K	3,46	0,846
AzCIB_2552	Fosfolipasa familia A2	T	3,45	0,866
AzCIB_1872	Malato deshidrogenasa	C	3,44	0,882
AzCIB_1852	Proteína putativa glicosiltransferasa	M	3,44	0,815
AzCIB_2042	Desoxirribonucleasa relacionada con TatD	L	3,42	0,803
AzCIB_2985	NADH deshidrogenasa, subunidad L	C,P	3,41	0,878
AzCIB_1865	Citrato sintasa	C	3,40	0,884
AzCIB_0851	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	G	3,40	0,848
AzCIB_0386	Citocromo C oxidasa	C	3,39	0,836
AzCIB_3029	O-succinilhomoserina sulfhidrilasa	E	3,38	0,832
AzCIB_0543	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa	M	3,35	0,869
AzCIB_2990	NADH deshidrogenasa, subunidad G	C	3,35	0,880
AzCIB_3076	Proteína factor de recombinación	L	3,33	0,852
AzCIB_1864	2-oxoglutarato deshidrogenasa, componente E1	C	3,33	0,876
AzCIB_4210	Anhidrasa carbónica	P	3,31	0,854
AzCIB_1053	Proteína de unión a soluto extracelular de la familia 3	E,T	3,24	0,866
AzCIB_0118	Tetrionato reductasa, subunidad C	P	3,23	0,819
AzCIB_1065	Lisina 2,3-aminomutasa	E	3,21	0,805
AzCIB_1343	Proteína hipotética NB231_10618		3,19	0,814

AzCIB_3761	Proteína con dominio CBS	R	3,17	0,823
AzCIB_1974	Fosfopiruvato hidratasa	G	3,17	0,845
AzCIB_1781	Beta-oxoacil-CoA tiolasa	I	3,17	0,821
AzCIB_0700	Proteína asociada a virulencia del tipo VapB	S	3,17	0,839
AzCIB_0337	Fenilacetato-CoA ligasa	H	3,14	0,814
AzCIB_0731	Adenilosuccinato sintetasa	F,E	3,13	0,842
AzCIB_1418	Proteína hipotética		3,12	0,828
AzCIB_4164	Proteína de biogénesis de fimbrias tipo IV	U	3,12	0,868
AzCIB_3782	Proteína FTSA de división celular	D	3,10	0,808
AzCIB_3295	Proteína hipotética AZKH_1208	R	3,08	0,837
AzCIB_2061	Proteína hipotética EbA6549	R	3,06	0,833
AzCIB_3637	Proteína hipotética AZKH_3570	R	3,05	0,853
AzCIB_3181	Imidazolonapropionasa	Q	3,04	0,855
AzCIB_3805	Proteína hipotética AZKH_3743		2,92	0,810
AzCIB_2919	Proteína bifuncional aconitato hidratasa/2-metilisocitrato deshidratasa	C	2,91	0,827
AzCIB_0618	Proteína de tipo hemeritina con dominio de unión a metal	P	2,89	0,837
AzCIB_4166	Proteína de ensamblaje de fimbrias tipo IV, PilO	N,U	2,81	0,836
AzCIB_0722	Proteína transmembrana	S	2,77	0,804
AzCIB_2079	Proteína hipotética AZKH_2441	S	2,77	0,826
AzCIB_0578	L-glutamina sintetasa	E	2,76	0,829
AzCIB_4165	Proteína de biogénesis de fimbrias tipo IV	N,U	2,74	0,823
AzCIB_2928	Proteína hipotética AZKH_2976	R	2,73	0,819
AzCIB_3109	Deshidrogenasa de cadena corta	I,Q,R	2,72	0,805
AzCIB_3123	Proteína hipotética AZKH_3234		2,68	0,809
AzCIB_2984	NADH deshidrogenasa, subunidad M	C	2,67	0,822
AzCIB_4045	RNA polimerasa, subunidad beta	K	2,63	0,825
AzCIB_0085	ATPasa tipo F transportadora de protones, subunidad delta	C	2,63	0,821
AzCIB_3049	Acetolactato sintasa I, subunidad grande	E,H	2,63	0,816
AzCIB_4167	Proteína de biogénesis de fimbrias tipo IV	N,U	2,61	0,817
AzCIB_0773	Chaperonina cpn10 (subunidad 10kDa)	O	2,56	0,810
AzCIB_3069	Proteína de unión a peptidoglicano	M	2,54	0,803
AzCIB_2991	NADH deshidrogenasa, subunidad F	C	2,52	0,802

VIII. DISCUSIÓN

1.- *Azoarcus* sp. CIB es capaz de desarrollar un estilo de vida endófito y posee características de PGPB

Las bacterias endófitas forman un grupo diverso de microorganismos que comparten características específicas que les permite adaptarse al ambiente de la endorrizosfera. Sin embargo, no se ha llegado a un consenso sobre el conjunto de características que deben tener los endófitos aunque se conocen algunas propiedades que permiten la adaptación al nicho ecológico y fomentan el crecimiento de las plantas colonizadas mediante la bioestimulación, la biofertilización o el biocontrol (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Glick, 2012; Gaiero *et al.*, 2013; Santoyo *et al.*, 2016).

Entre las bacterias endófitas mejor caracterizadas se encuentra la cepa *Azoarcus* sp. BH72 (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). Como se ha ido indicando en el apartado 1 de la Introducción, el género *Azoarcus* está compuesto principalmente por dos grupos filogenéticos diferenciados, uno que comprende bacterias de vida libre especializadas en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos y otro formado por endófitos de plantas (Reinhold-Hurek y Hurek, 2000; Rabus, 2005; Martín-Moldes *et al.*, 2015; Faoro *et al.*, 2017). Hasta la realización de esta Tesis no se había descrito todavía la capacidad de vivir como endófito de un *Azoarcus* perteneciente al grupo especializado en la degradación de compuestos aromáticos. Sin embargo, el análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB permitió la identificación de algunos caracteres genéticos relacionados con la interacción con planta (Tabla 2) y que previamente habían sido descritos en bacterias endófitas, como *Azoarcus* sp. BH72 (Krause *et al.*, 2006). Por ello, el primer objetivo de esta Tesis fue la demostración experimental de la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para establecerse como endófito del arroz.

Los experimentos de interacción con planta realizados permitieron recuperar *Azoarcus* sp. CIB del interior de la raíz del arroz (10^4 - 10^5 UFC/g raíz) (Fig. 14). Pese a que este valor es ligeramente inferior al obtenido con la cepa control, *i.e.*, el endófito *A. communis* (10^6 UFC/g raíz), y al descrito en la literatura con las cepas endófitas *Azoarcus* sp. BH72 y *A. olearius* DQS-4 (hasta 10^{10} UFC/g raíz) (Hurek *et al.*, 2002; Faoro *et al.*, 2017), permite confirmar claramente la

propiedad de *Azoarcus* sp. CIB para establecerse como endófito del arroz. En este punto es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones a la hora de valorar los datos de colonización de la planta. Por un lado, los datos de recuperación de bacterias endófitas no pueden tomarse, en sí mismos, como un único valor de referencia ya que existe una gran variabilidad entre especies y condiciones testadas. Así, por ejemplo, para *B. phytofirmans* PsJN, se han llegado a aislar del orden de 10^7 - 10^8 UFC/mg de la endosfera de raíz de *A. thaliana* (Poupin *et al.*, 2013), mientras que la inoculación de chopo con bacterias endófitas del mismo género, aisladas previamente de esa especie de árbol, reveló una colonización de la endosfera de raíz de 10^7 UFC/g raíz (Timm *et al.*, 2016). Por otro lado, tampoco existe un consenso sobre el número óptimo de endófitos que una planta debe albergar. Aunque el promedio de endófitos de una planta en la naturaleza ronda los 10^3 - 10^4 UFC/g de raíz, se ha postulado que para la observación de claros efectos beneficiosos sobre el hospedador, *e.g.*, fijación de N_2 , se deben obtener del orden de 10^6 - 10^7 UFC/g raíz (Spaepen *et al.*, 2009). En la misma línea, se han realizado estudios que resaltan la importancia del inóculo en el desarrollo de la interacción planta-bacteria comparando cómo diferentes grados de inoculación con el endófito en estudio, *i.e.*, *Azospirillum brasilense*, afecta a la planta hospedadora. Así, se determinó que el nivel de inóculo óptimo para observar un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las raíces en trigo fue de 10^3 - 10^6 UFC/ml, si bien no se detalla el número de bacterias que finalmente se instalan en la rizosfera. Sin embargo, en el mismo sistema de estudio, cuando se inoculaba con 10^8 - 10^9 UFC/ml se producía una inhibición del crecimiento de la planta debido al efecto antagónico que tiene una alta producción de IAA (Kapulnik *et al.*, 1985). Por otro lado, también conviene tener en cuenta la importancia que tiene el medio de cultivo en el que se crecen las bacterias una vez aisladas de la planta para el cálculo de la viabilidad de los endófitos recuperados. Así, algunos estudios han revelado variaciones de hasta el 80% en el número de endófitos aislados de plantas cultivadas en las mismas condiciones dependiendo solamente del medio de cultivo utilizado para su aislamiento (Eevers *et al.*, 2015). Por ello, son necesarios estudios más exhaustivos sobre las relaciones existentes entre el tamaño de inóculo bacteriano utilizado, los efectos sobre la planta estudiados y el

número de UFC recuperadas tras el reaislamiento de las bacterias del interior de la planta.

La confirmación *in planta* de la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para vivir como endófito se llevó a cabo mediante varias técnicas microscópicas que permitieron su observación e identificación en la raíz (Fig. 15 y 16). Mediante microscopía de epifluorescencia, se observaron células de la cepa CIB que expresan la proteína fluorescente verde GFP en el interior de la raíz del arroz (Fig. 15). En este experimento resultó especialmente significativo el cambio de morfología observado a partir del día 5 de la inoculación, en el que las células pasaron de tener la típica morfología bacilar, que presenta la bacteria cuando se encuentra en vida libre, a mostrar otra morfología más pequeña y redondeada con la formación de microcolonias. Un cambio de morfología similar ya había sido descrito previamente en otras bacterias que interaccionan con la planta (Li *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2000), y se especula que es consecuencia de la adaptación de la bacterias al ambiente de la endorrizosfera, lo que implica un cambio significativo en el acceso a los nutrientes disponibles y una mayor tolerancia a ROS que en el estado de vida libre (Buonaurio, 2008; Hardoim *et al.*, 2015; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Así, el proceso de adaptación implica una menor tasa de crecimiento de las bacterias (Germaine *et al.*, 2004) y una mayor tendencia a la formación de *biofilms* y microcolonias como mecanismo de adhesión a las células vegetales, de defensa a ROS y de promoción de un ambiente anaeróbico que permita la fijación de N₂ (Dong *et al.*, 2002; Flemming *et al.*, 2016).

La utilización de técnicas de microscopía confocal (Fig.16) confirmó la presencia de *Azoarcus* sp. CIB en las capas internas de la raíz, y permitió visualizar claramente su disposición formando microcolonias. Estas imágenes obtenidas recuerdan a las que previamente se observaron con *Azoarcus* sp. BH72 durante la colonización de raíces de arroz (Egener *et al.*, 1998).

La utilización de técnicas de microscopía electrónica (Fig. 18) permitió, por un lado, la localización específica de *Azoarcus* sp. CIB en los espacios intercelulares de la raíz, lo que concuerda con observaciones previas de ese tipo de endófitos que no colonizan intracelularmente (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Por otro lado, las técnicas inmunocitoquímicas

(anticuerpos frente a la subunidad NifH) permitieron detectar la producción de la enzima nitrogenasa dentro de las bacterias endófitas (Fig. 18) sugiriendo la capacidad de la cepa CIB para fijar nitrógeno durante su establecimiento en la endorrizosfera. Como se ha comentado en la Introducción, la fijación de nitrógeno es una de las principales propiedades de las PGPBs y ya fue confirmada en *Azoarcus* sp. BH72 en el interior de raíces de arroz (Egener *et al.*, 1999) aunque, por el momento, no ha sido posible confirmar la capacidad de fijación de N₂ *in vivo* en *A. olearius* DQS-4 (Faoro *et al.*, 2017). En la figura 18 también se observa que los anticuerpos anti-NifH se unieron mayoritariamente a las células presentes en las capas radiculares más internas, es decir, en la última capa de la exodermis en contacto con el parénquima, lo que está de acuerdo con el hecho de que la fijación de nitrógeno es un proceso sensible al oxígeno y, por ello, debería estar impedido en las capas más cercanas a la superficie radicular.

En su conjunto, los resultados de colonización de arroz por *Azoarcus* sp. CIB están de acuerdo con el esquema general de colonización endorrizosférica de plantas por bacterias endófitas (apartado 2.2 de la Introducción). Las imágenes de microscopía de fluorescencia (Fig. 15) muestran una mayor concentración de las bacterias alrededor de las zonas de elongación de las raíces secundarias. Las bacterias pueden penetrar al interior de la raíz aprovechando las roturas del tejido radicular que se dan en las zonas de elongación de las raíces secundarias, tal y como ha sido previamente descrito (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003; Faoro *et al.*, 2017). Una vez que las bacterias han atravesado la capa externa de la raíz, son capaces de colonizar todas las capas de la exodermis (Fig. 18C) hasta llegar al parénquima (Fig. 18E). Aunque en este trabajo no se han observado bacterias en capas más internas de la raíz, en un futuro se deberán abordar experimentos a tiempos más largos que permitan estudiar la posibilidad de una colonización sistémica por *Azoarcus* sp. CIB y dilucidar si esta cepa puede traspasar el córtex y llegar al xilema para extenderse a otros tejidos de la planta, como se ha observado con la cepa BH72 (Hurek *et al.*, 1994).

Durante la realización de los experimentos de interacción entre *Azoarcus* sp. CIB y el arroz se pudo observar, tal y como se había descrito con anterioridad para *Azoarcus* sp. BH72 (Hurek *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006), que la

inoculación de *Azoarcus* sp. CIB no producía efectos perniciosos en el desarrollo de las plántulas de arroz. Además, se demostró que tampoco afectaba negativamente al desarrollo del tabaco, planta modelo empleada en los ensayos de patogenésis (Fig. 21) (Klement, 1963; Hurek *et al.*, 1994). Aun así, se ha de ser cauteloso con la terminología y, como ya se indicó en la Introducción, utilizar el término endófito para una bacteria que en las condiciones estudiadas no presenta efectos patogénicos. De acuerdo a este concepto, se puede confirmar que *Azoarcus* sp. CIB no es un patógeno ni de tabaco ni de arroz, la planta modelo utilizada en este trabajo.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha realizado una búsqueda de propiedades PGP que pudiesen estar presentes en *Azoarcus* sp. CIB. Así, se ha podido demostrar su capacidad para fijar nitrógeno (Tabla 7), producir IAA (Fig. 20) y solubilizar fosfatos (Fig. 19). A pesar del extenso trabajo existente sobre *Azoarcus* sp. BH72, no existe información detallada sobre sus propiedades PGP, más allá de la fijación de nitrógeno que ha sido ampliamente estudiada (Egener *et al.*, 1998, 1999; Hurek *et al.*, 2002) y de su incapacidad, derivada del análisis de su genoma, para producir IAA (Mitter *et al.*, 2013) y sideróforos (Krause *et al.*, 2006). En contraste, en la bacteria endófito relacionada *A. olearius* DQS-4, sí se ha realizado recientemente una caracterización detallada de sus propiedades PGP y se sabe que no es capaz ni de producir IAA ni de solubilizar fosfatos, pero sí se ha determinado la producción de sideróforos (Faoro *et al.*, 2017), algo que no ha podido confirmarse ni en *Azoarcus* sp. BH72 ni en *Azoarcus* sp. CIB.

En general, el análisis de las propiedades PGP presentes en bacterias del género *Azoarcus* revela la existencia de una gran heterogeneidad entre cepas. Por un lado, los análisis filogenéticos previos de los genes *nifH* y *nifD*, realizados en el género *Azoarcus*, han sugerido que éstos pueden haber sido adquiridos en eventos de transferencia horizontal ocurridos en diferentes momentos evolutivos (Hurek *et al.*, 1997; Faoro *et al.*, 2017). Esta hipótesis está sustentada por el análisis de los árboles filogenéticos que engloban en clados claramente diferenciados a los genes *nif* de las especies pertenecientes al grupo especializado en degradación anaeróbica de compuestos aromáticos (genes *nif* similares a los de *Burkholderia* spp. y α -*Proteobacteria*), y a los genes *nif* del grupo

especializado en la interacción con planta (genes *nif* similares a los de *Azonexus* y γ -*Proteobacteria*) (Hurek *et al.*, 1997; Faoro *et al.*, 2017).

Por otro lado, el estudio de la producción de IAA reveló que *Azoarcus* sp. CIB produce esta fitohormona mientras que la cepa endófito *A. communis* no (dato no mostrado). Estos resultados, junto con los descritos en la literatura (ver más arriba), permiten postular la hipótesis de que la síntesis de IAA no está presente en las bacterias del género *Azoarcus* especializadas en la interacción con planta, quedando por demostrar si otras bacterias del género, además de *Azoarcus* sp. CIB, pueden sintetizar esta fitohormona. A pesar de su gran capacidad de producción de IAA, el análisis del genoma de CIB no ha permitido determinar claramente los genes y rutas metabólicas involucradas en la síntesis de IAA (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Sin embargo, gracias al estudio transcriptómico que se realizó durante esta Tesis Doctoral, se observó que el gen AzCIB_2320, que codifica una posible indolacetaldehído-deshidrogenasa, se encuentra diferencialmente inducido en presencia de extractos de arroz (Tabla S1), lo que sugiere su posible implicación en una ruta de biosíntesis de IAA (ver apartado 3 de la Discusión).

En conjunto, los resultados mostrados en este trabajo confirman que *Azoarcus* sp. CIB puede vivir como endófito de arroz y que, además, presenta características de PGPB, constituyendo el primer ejemplo de bacteria de su género perteneciente al grupo especializado en degradación de compuestos aromáticos capaz de adaptarse a este estilo de vida. Por otro lado, este trabajo revela por primera vez que la clasificación en grupos filogenéticos dentro del género *Azoarcus* no debe ir necesariamente asociada al estilo de vida de sus miembros, ya que algunos de ellos, como por ejemplo *Azoarcus* sp. CIB, pueden presentar una gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Además, las diferencias descritas en este trabajo respecto a las propiedades PGP (producción de IAA y solubilización de fosfato), junto con las observaciones previas que revelan diferencias filogenéticas del complejo nitrogenasa (Hurek *et al.*, 1997; Faoro *et al.*, 2017) entre las bacterias del género *Azoarcus*, revelan la diversidad existente entre las distintas cepas de este género y alertan de la dificultad para clasificarlas en subgrupos en base a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas.

2.- *Azoarcus* sp. CIB es capaz de promover el crecimiento del arroz

A lo largo de la Tesis Doctoral se ha remarcado la dificultad que presenta el estudio del sistema bacteria-planta y la falta de datos para entender el desarrollo de estas interacciones a nivel molecular. Esto es debido, en gran parte, a que la mayoría de las investigaciones se centran en el estudio de un efecto en concreto sin llegar a conocer su alcance real y las sinergias y antagonismos que tienen lugar durante la interacción. Un ejemplo concreto es la observación de que la producción de IAA en grandes cantidades puede afectar negativamente al crecimiento vegetal debido a la estimulación de la síntesis de etileno (Burg y Burg, 1966; Spaepen *et al.*, 2007; Glick, 2012). De hecho, presentar una gran batería de propiedades PGP no siempre implica un gran efecto en la promoción del crecimiento vegetal, habiéndose observado que bacterias que poseen un reducido número de propiedades PGP también consiguen aumentar el crecimiento vegetal (Smyth *et al.*, 2011). Por todo lo comentado anteriormente, el hecho de comprobar la existencia de varias propiedades PGP en *Azoarcus* sp. CIB (ver más arriba) no era una prueba suficiente para poder clasificar a esta bacteria como promotora del crecimiento vegetal.

Los experimentos de colonización de *Azoarcus* sp. CIB sobre arroz demostraron que las plantas inoculadas con la cepa CIB producían alrededor de un 30% más de biomasa (Fig. 22), sin que este aumento de la biomasa se tradujera en una mayor longitud radicular o del tallo. Además, para poder confirmar que el efecto PGP se debía a alguna de las propiedades presentes en *Azoarcus* sp. CIB y descartar un posible efecto fertilizador de la materia orgánica aportada por las bacterias, se llevó como control la inoculación de arroz por *E. coli* (cepa no endófito) que no produjo ningún efecto significativo sobre el crecimiento vegetal (Fig. 22). Resultados similares se han descrito tras inocular arroz con *Serratia* sp., una PGPB fijadora de nitrógeno en la que se observó un aumento significativo de la biomasa del arroz sin afectar al crecimiento radicular y aéreo (Sandhiya *et al.*, 2005). Asimismo, los datos existentes sobre el crecimiento del arroz al inocular con *Azoarcus* sp. DQS-4 mostraron un incremento de biomasa, tanto del tallo como de la raíz, en torno al 50% (Faoro *et al.*, 2017) aunque, desafortunadamente,

en ese trabajo no se presentaron los datos de longitud del tallo y raíz. Curiosamente, la inoculación de arroz con la cepa BH72 tan solo mejoró un 15% el crecimiento de las plántulas, e incluso lo redujo un 25% si las plantas crecían en medio suplementado con malato (Hurek *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek y Hurek, 1997). Esta observación se achacó a una gran concentración de bacterias en el meristemo apical lo que causaría un perjuicio a la planta (Hurek *et al.*, 1994), confirmando la complejidad de factores a tener en cuenta cuando se estudian las relaciones beneficiosas-perjudiciales entre plantas y bacterias. Finalmente, el aumento de biomasa observado cuando se inocula el arroz con la cepa CIB sugiere que la promoción del crecimiento se debe más a un proceso de biofertilización debido a la fijación de nitrógeno por *Azoarcus* sp. CIB, que a la producción de IAA la cual redundaría en un mayor crecimiento radicular o una inhibición, dependiendo del nivel de producción de IAA bacteriano (Sandhiya *et al.*, 2005; Spaepen *et al.*, 2007). No obstante, la determinación del factor(es) implicado en la promoción del crecimiento del arroz por parte de *Azoarcus* sp. CIB deberá ser objeto de estudio futuro.

Con el objetivo de obtener una cepa con mayor potencial como promotora del crecimiento vegetal se introdujo una nueva propiedad PGP en *Azoarcus* sp. CIB. Así, de entre las principales propiedades PGP descritas y no presentes en *Azoarcus* sp. CIB, ni en ninguna bacteria del género *Azoarcus* caracterizadas hasta la fecha, se decidió implementar la actividad ACC desaminasa (ver apartado 2.3.1 de la Introducción) debido a: (i) su amplia distribución entre bacterias que interaccionan con planta, (ii) el efecto visible sobre la planta, incluso con bajos niveles de expresión, (iii) la facilidad de introducción en *Azoarcus* sp. CIB al estar codificada por un único gen, y (iv) la posibilidad de testar rápidamente la actividad ACC desaminasa mediante un ensayo enzimático estandarizado (Penrose y Glick, 2003; Glick, 2005, 2014; Santoyo *et al.*, 2016). Por ello, se clonó en un plásmido multicopia el gen *acdS* de la bacteria modelo *B. phytofirmans* PsJN (Tabla 4) y se comprobó su funcionalidad demostrando la adquisición de la actividad ACC desaminasa en la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) (Fig. 23). Estos resultados constituyen el primer ejemplo que se describe en la literatura de clonación y expresión funcional de un gen *acdS* heterólogo en una bacteria del orden *Rhodocyclales*. El plásmido pSEVA237*acdS* representa así una nueva

herramienta genética para intentar expandir la actividad ACC desaminasa a bacterias que carecen de dicha actividad.

Para confirmar si la nueva cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) tenía realmente incrementado su potencial PGP, se probó si su inoculación en arroz confería un mayor crecimiento vegetal en condiciones de estrés que desencadenan altas concentraciones de etileno en la planta. Con este fin, se utilizó cadmio, metal que había sido previamente descrito como inductor de estrés, especialmente estrés oxidativo, y que aumenta los niveles de etileno en plantas (Steffens, 2014). Bacterias productoras de fitohormonas, como el IAA, y con actividad ACC desaminasa promueven el crecimiento de arroz en condiciones de estrés a cadmio, aunque los mecanismos moleculares no han podido ser completamente dilucidados (Treesubuntorn *et al.*, 2017). Además, también en arroz, se había estudiado el papel del gen *acdS* en la promoción del crecimiento en condiciones de estrés a metales pesados, en este caso níquel, al comprobar que tras inocular con una cepa mutante, sin capacidad ACC desaminasa, no se observaba una mejora del crecimiento del arroz (Han *et al.*, 2015). La relación entre metales pesados y etileno ya había sido también descrita y revisada por Arshad y colaboradores (2007) en plantas transgénicas que expresan el gen bacteriano *acdS* por lo que tienen concentraciones menores de etileno que las plantas silvestres, y eran capaces de resistir mejor el estrés mediado por metales pesados que las plantas silvestres. Los resultados presentados en este trabajo revelan que la expresión del gen *acdS* en *Azoarcus* sp. CIB permite un mayor crecimiento del arroz en presencia de cadmio, ya que las plantas inoculadas con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) mostraron una mayor biomasa que las inoculadas con la cepa control *Azoarcus* sp. CIB, y que, por supuesto, el control sin inocular (Tabla 8, Fig. 24).

Como se ha indicado anteriormente, existe una relación directa entre los niveles de ROS celular y los niveles de etileno en la planta. Así, plantas mutantes de *A. thaliana* insensibles a etileno mostraban una menor formación de aniones superóxido (ROS) en condiciones de estrés oxidativo que las plantas silvestres (Keunen *et al.*, 2016). De igual forma, se ha descrito una reducción de la actividad superóxido dismutasa en plantas inoculadas con PGPBs con actividad ACC

desaminasa en condiciones de estrés oxidativo mediado por metales y compuestos aromáticos (Weyens *et al.*, 2010, 2015). Por ello, para tratar de confirmar que la promoción del crecimiento del arroz inoculado con *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) en presencia de cadmio estaba directamente relacionada con una disminución de los niveles de etileno en la planta, se procedió a valorar ROS midiendo la actividad SOD en planta. Como cabría esperar, la presencia de cadmio aumentaba significativamente la actividad SOD en la planta (Fig. 25). Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) mostraban unos niveles de actividad SOD claramente inferiores a los de la planta inoculada con la cepa silvestre o a los de la planta sin inocular (Fig. 25). Estos resultados sugieren, por lo tanto, una disminución de los niveles de etileno en la planta inoculada con la cepa recombinante que expresa el gen *acdS*, lo que finalmente redundaría en un mayor crecimiento vegetal en condiciones de estrés tales como la presencia de metales tóxicos. No obstante, no puede descartarse que parte del efecto de promoción del crecimiento observado pueda deberse no tanto a la reducción de los niveles de etileno en la planta sino a un efecto biofertilizante debido al incremento del amonio biodisponible en la rizosfera por acción de la enzima ACC desaminasa producida por la cepa recombinante *Azoarcus* sp. CIB (pSEVA237*acdS*) (Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

En conjunto, todos estos resultados demuestran por primera vez que la clonación y expresión heteróloga de un gen *acdS* en una bacteria que interacciona con arroz es una estrategia exitosa para promover el crecimiento de la planta en ambientes contaminados con cadmio.

3.- Identificación de genes de *Azoarcus* sp. CIB implicados en la adaptación a un estilo de vida endófito

Como se ha indicado anteriormente, se conoce relativamente poco sobre los mecanismos moleculares que controlan en bacterias la transición de un estilo de vida libre a un estilo de vida endófito. Para tratar de aportar algún conocimiento nuevo en este campo, se utilizó la interacción *Azoarcus* sp. CIB-arroz como modelo de estudio. Para ello se llevaron a cabo dos abordajes experimentales

complementarios: (i) la mutación de posibles genes previamente sugeridos como necesarios para la interacción con planta, *i.e.*, genes del flagelo y *pili* tipo IV, y (ii) un análisis transcriptómico global en respuesta a extractos de raíz de arroz identificando genes diferencialmente expresados que podrían estar implicados en la interacción con la planta.

3.1.- Estudio de los genes del flagelo y de los *pili* tipo IV en la interacción *Azoarcus* sp. CIB-planta.

Resultados previos obtenidos por el grupo de la Dra. B. Reinhold-Hurek con la bacteria endófito *Azoarcus* sp. BH72 sugerían que los genes que codifican el flagelo y los *pili* tipo IV son importantes para la interacción bacteria-planta (Dörr *et al.*, 1998; Böhm *et al.*, 2007; Buschart *et al.*, 2012; Hauberg-Lotte *et al.*, 2012; Shidore *et al.*, 2012).

En *Azoarcus* sp. CIB se ha identificado la presencia de, al menos, cuatro *clusters* relacionados con la biosíntesis y funcionalidad de los *pili* tipo IV (Tabla 2) y cuya organización génica se representa en la figura 56: (i) el *cluster pilEfimTpilVWXYZ1* que codifica la pilina mayoritaria PilE y las pilinas minoritarias FimT, PilV, PilW y PilX, además de la proteína PilY1 que está implicada en la síntesis y estabilización la estructura de los *pili* tipo IV; (ii) el *cluster pilBCC'D* que codifica PilB, una ATPasa involucrada en la polimerización de las pilinas, PilC, una proteína integral de membrana con función estructural, PilC', una duplicación de un fragmento de PilC, y PilD, una peptidasa involucrada en la maduración de las prepilinas a pilinas; (iii) el *cluster pilMNOPQ* que codifica PilM, PilN, PilO y PilP, que son proteínas estructurales ligadas a la membrana interna bacteriana e involucradas en la secreción de las pilinas, y PilQ, una secretina ligada a membrana externa; (iv) el *cluster pilGHIJL* ligado a la respuesta quimiotáctica y que codifica las proteínas PilG y PilH, reguladores de respuesta, Pill, PilJ, quimiorreceptores, y PilL, una histidina quinasa sensora (Darzins, 1994; Whitchurch *et al.*, 2004; Ayers *et al.*, 2009; Gilbert *et al.*, 2014; Sampedro *et al.*, 2014; Maier y Wong, 2015; Nguyen *et al.*, 2015).

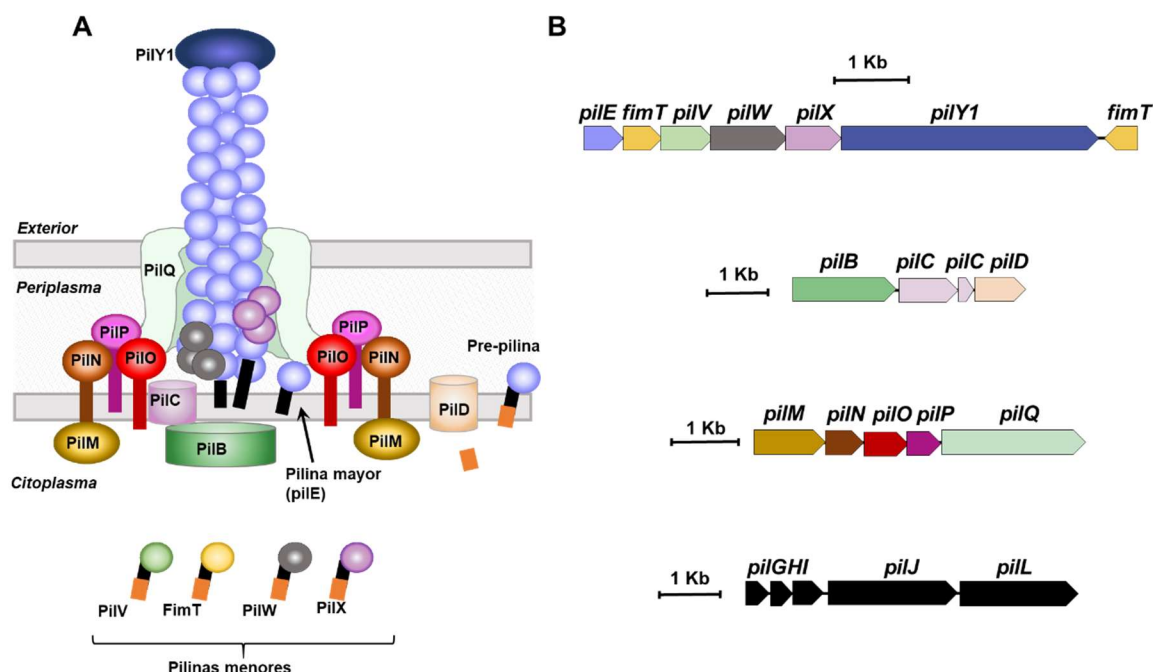


Figura 56. Modelo estructural de los *pili* tipo IV en *Azoarcus* sp. CIB. A) Estructura predicha de los *pili* tipo IV en *Azoarcus* sp. CIB de acuerdo a la anotación genómica. Adaptado de Mattick, (2002); Melville y Craig, (2013) y Maier y Wong, (2015). **B)** *Clusters* génicos anotados en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB relacionados con la síntesis y funcionalidad de los *pili* tipo IV. El código de colores de los genes se corresponde con el de las proteínas del panel A, a excepción del *cluster pilGHIJL* que codifica proteínas sensoras y de respuesta quimiotáctica que no se detallan en A.

En *Azoarcus* sp. BH72 se demostró que la delección del gen *pilX* (codifica una pilina minoritaria de los *pili* tipo IV) (Dörr *et al.*, 1998; Giltner *et al.*, 2012) no inhibía la formación de los *pili* pero sí su funcionalidad, ya que afectaba a la movilidad de tipo *twitching* (Shidore *et al.*, 2012). Este tipo de movilidad es esencial para la correcta colonización del arroz por esta bacteria (Böhm *et al.*, 2007). Experimentos de colonización endofítica con la cepa *Azoarcus* sp. BH72 mutante en *pilX* demostraron una disminución en torno al 80% en su capacidad colonizadora respecto a la cepa silvestre (Shidore *et al.*, 2012). Además de su función en la movilidad, se ha descrito que tanto las pilinas menores como PilY1 tienen un papel fundamental en la adhesión de bacterias patógenas a las células del huésped (Hardoim *et al.*, 2008; Sheibani-Tezerji *et al.*, 2015). Por todo ello se decidió estudiar si la mutación de los genes *pil* también afectaba a la interacción de la cepa CIB con el arroz. Con este fin, se procedió a la construcción de una cepa CIB mutante por inserción en el gen *pilX*, la cual provocó efectos polares al menos sobre el gen contiguo *pilY1* (Fig. 26). Aunque es el *twitching* el tipo de

movilidad bacteriana principalmente mediada por los *pili* (Mattick, 2002) todos los intentos de detectar este tipo de movilidad en *Azoarcus* sp. CIB fueron infructuosos. No obstante, la movilidad de tipo *swarming* también está mediada por los *pili*, así como por el flagelo (Kaiser, 2007), y estudios previos en *P. aeruginosa* han mostrado que la mutación de los *pili* tiene un efecto negativo sobre la capacidad de *swarming* de la bacteria (Köhler *et al.*, 2000; Kuchma *et al.*, 2012), lo cual permite utilizar el *swarming* como una medida de la funcionalidad de los *pili*. Como cabría esperar, la mutación de los genes *pilXY1* causó una clara deficiencia en la movilidad de tipo *swarming* en la cepa CIB mutante respecto a la silvestre (Fig. 27), lo que confirmaba la inactivación de la función deseada. Cuando se comparó la capacidad de colonización endofítica de arroz de la cepa CIB silvestre con la de la cepa mutante *Azoarcus* sp. *CIBdpilX*, se observó la disminución en más de un orden de magnitud del número de UFC extraídas de la endorrizosfera respecto a la cepa silvestre (Fig. 27), lo cual confirma la participación de los genes *pil* en alguna de las etapas del mecanismo de interacción de la cepa CIB con el arroz. Dado que los estudios de interacción con planta del mutante *pilX* de *Azoarcus* sp. BH72 se realizaron mediante un ensayo de competición entre la cepa parental y la cepa mutante (Shidore *et al.*, 2012) es difícil poder comparar estos datos con los resultados obtenidos en esta tesis y saber si la mutación polar sobre *pilY1* en *Azoarcus* sp. CIB tiene algún efecto adicional al observado con la mutación exclusiva de *pilX* en *Azoarcus* sp. BH72. La realización de experimentos de competencia entre *Azoarcus* sp. CIB y la cepa mutante *Azoarcus* sp. *CIBdpilX* en ensayos de colonización del arroz permitirán profundizar un poco más en este tema.

Azoarcus sp. CIB posee tres *clusters* génicos que controlan la síntesis y funcionalidad de, al menos, un flagelo polar (Tabla 2, Fig. 57): (i) una gran agrupación génica que abarca ~37 Kb y en la que se han anotado 39 genes que codifican la mayoría de las proteínas estructurales y reguladoras (proteínas Flg, Fli, Fle y Fla) del flagelo; (ii) un segundo *cluster* con cuatro genes que codifican las proteínas principales del motor del flagelo (MotA y MotB) y los reguladores transcripcionales (FlhC y FlhD); (iii) un tercer *cluster* compuesto por 7 genes que incluyen una segunda copia de los genes *motA* y *motB*, genes que codifican las proteínas estructurales del sistema de exportación FlhA y FlhB, y los genes

reguladores *fliA*, *fleN* y *flhF* (Minamino *et al.*, 2008; Konishi *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010; Morimoto y Minamino, 2014; Partridge *et al.*, 2015).

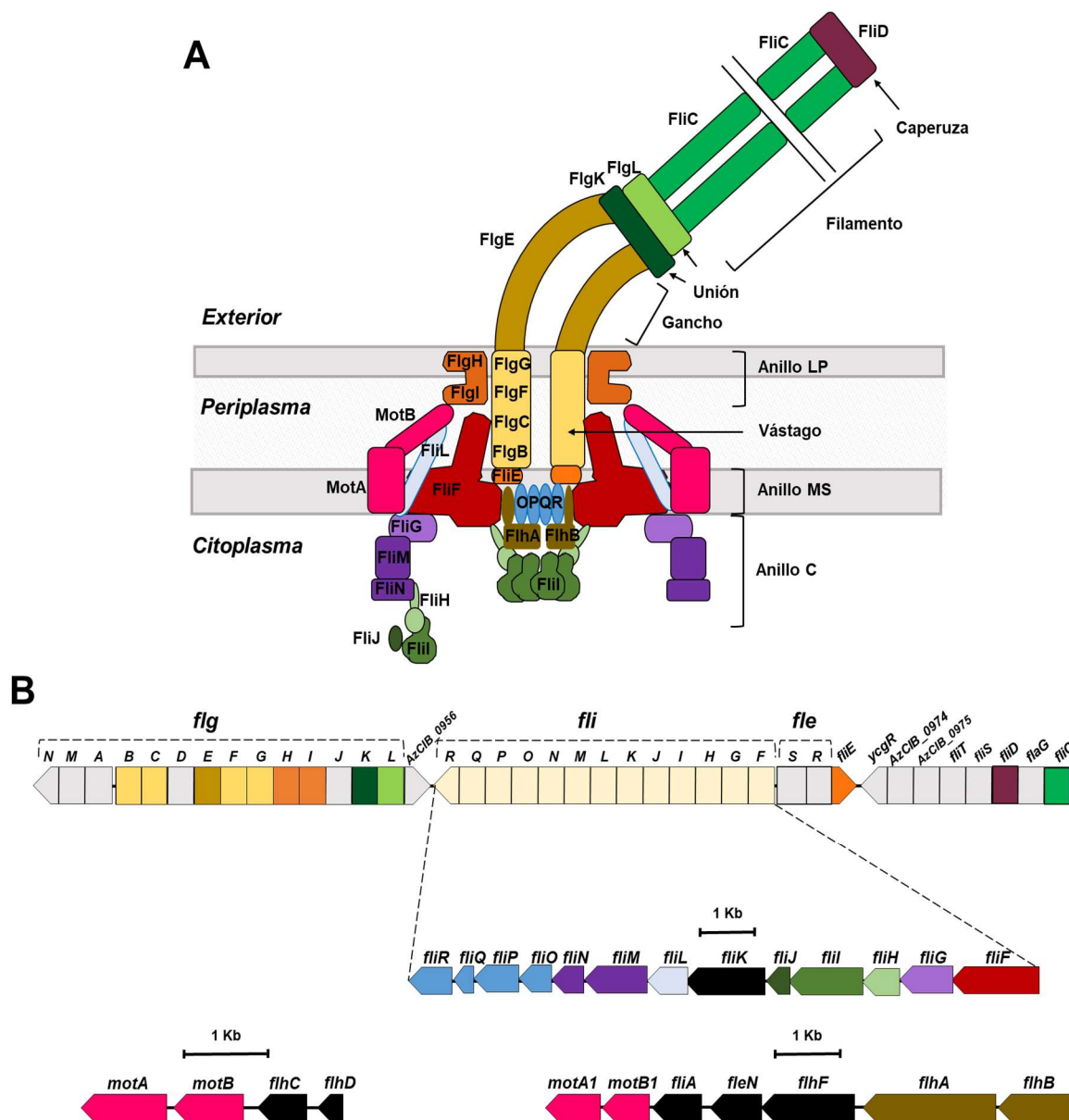


Figura 57. Modelo estructural del flagelo de *Azoarcus* sp. CIB. **A)** Principales proteínas estructurales del flagelo bacteriano. Adaptado de Minamino *et al.*, (2008) y Morimoto y Minamino, (2014); Partridge *et al.*, (2015). **B)** Clusters génicos anotados en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB relacionados con la síntesis y funcionalidad de del flagelo. El código de colores de los genes se corresponde con el de las proteínas del panel A, a excepción de los genes marcados en gris (genes estructurales con función desconocida o no detallados en A y en negro (genes que codifican proteínas reguladoras no representadas en A).

La delección del gen *fliC3* (codifica la principal flagelina, FliC, del flagelo) en *Azoarcus* sp. BH72 conlleva la pérdida total del flagelo y un acusado defecto en la

interacción con la planta que se traduce en una disminución en torno al 80% en su capacidad colonizadora cuando se realizan ensayos de competición entre la cepa silvestre y la mutante (Buschart *et al.*, 2012). Aunque estos resultados sugerían que el flagelo está implicado en la interacción *Azoarcus*-planta, no permitían discriminar si para dicha interacción es necesaria la pérdida completa del flagelo o, por el contrario, es suficiente con un flagelo que mantenga su estructura básica pero que no sea plenamente funcional. Para tratar de responder a la anterior pregunta utilizando *Azoarcus* sp. CIB-arroz como modelo de estudio, se decidió construir una cepa CIB mutante en el gen *fliM*. La proteína FliM se localiza, junto con FliN y FliG, en el llamado "anillo C" del flagelo (Fig. 57) que se encuentra anclado a la membrana celular y orientado hacia el citoplasma, y está implicado en el control de la exportación y en el sentido del movimiento del flagelo (Paul *et al.*, 2010; Morimoto y Minamino, 2014).

La mutación por inserción en el gen *fliM* conllevó también efectos polares sobre los genes localizados en posición 3' al lugar de la inserción, viéndose afectados al menos los genes *fliN* y *fliO* (Fig. 29), este último codifica una proteína del sistema de exportación (Tsang y Hoover, 2014), por lo que el mutante *fliM* podría tener comprometida la síntesis y función del anillo C. En *E. coli* y *Salmonella typhimurium* la mutación de genes del motor y del anillo C genera un fenotipo *mot*, bacterias que presentan flagelo pero que ven comprometida su movilidad (Zhao *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas con la cepa CIB mutante en *fliM* fueron similares a los descritos con las cepas mutantes de *E. coli* y *S. typhimurium* (Tsang y Hoover, 2014). En primer lugar, se pudo comprobar mediante microscopía electrónica la presencia del flagelo en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dfliM* (Fig. 28), lo que confirmó que la mutación no impedía la síntesis de la estructura básica del flagelo. Además, observaciones preliminares realizadas mediante grabaciones del movimiento bacteriano en microscopía óptica permitieron detectar una menor capacidad de movilidad y de control del sentido de rotación en la cepa mutante *fliM* que en la cepa silvestre (datos no mostrados). En segundo lugar, se confirmó la alteración del fenotipo de movilidad mediante ensayos de *swimming* en los que se observó una pérdida de la capacidad de movimiento del 50% en la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dfliM* respecto a la cepa silvestre (Fig. 30A), lo que indicaba que el flagelo sintetizado no era plenamente funcional.

Cuando se realizó el experimento de colonización de las raíces de arroz, se observó que la cepa *Azoarcus* sp. *CIBdflIM* generaba en torno a un orden de magnitud menos endófitos que la cepa silvestre (Fig. 30B). En conclusión, el conjunto de estos resultados confirma la implicación del flagelo en la interacción de *Azoarcus* con el arroz, y revela que dicha interacción no solo requiere una estructura flagelar más o menos completa, sino que además ésta debe ser plenamente funcional.

3.2.- Análisis transcriptómico global en respuesta a extractos de raíz de arroz

Con el objetivo de tratar de conocer determinantes genéticos no descritos hasta la fecha y que puedan estar implicados en nuevos mecanismos de interacción planta-bacteria, se decidió realizar un estudio de expresión génica global en *Azoarcus* sp. CIB interaccionando con la planta. Sin embargo, existen todavía una serie de limitaciones técnicas que impiden la realización del estudio de la bacteria *in planta*, siendo la principal dificultad la imposibilidad de extracción de una cantidad suficiente, y en buen estado, de RNA bacteriano de bacterias presentes en la endorrizosfera. Estas limitaciones han llevado a los investigadores a la búsqueda de alternativas que permitan de alguna forma mimetizar las condiciones a las que las bacterias endófitas han de adaptarse durante la colonización de las plantas. Estas alternativas principalmente incluyen: (i) la utilización de extractos de plantas, realizado en un estudio de la respuesta transcriptómica de bacterias patógenas (Crozier *et al.*, 2016) y en estudios de proteómica con la bacteria endófito *H. seropedicae* (Cordeiro *et al.*, 2013); (ii) la suplementación de medios de cultivo con exudados radiculares, como los estudios transcriptómicos realizados en *Azoarcus* sp. BH72 (Shidore *et al.*, 2012) y *Bacillus mycoides* (Yi *et al.*, 2017); (iii) la formulación de medios de cultivo sintéticos que tratan de mimetizar las señales que la bacteria detecta en el contacto con la planta, como en el estudio transcriptómico de la PGPB *Enterobacter* sp. 368 (Taghavi *et al.*, 2015); (iv) limitar el estudio solamente a las bacterias presentes en el rizoplasma que pueden ser fácilmente aisladas, como en el estudio transcriptómico realizado en *H. seropedicae* (Pankiewicz *et al.*, 2016).

En esta tesis se abordó el análisis transcriptómico global con una suspensión de bacterias incubadas en presencia de extractos de raíz de arroz a temperatura ambiente. Este abordaje, aunque presenta la limitación de la alta complejidad de los extractos y la dificultad de conocer su composición, mimetiza en cierta medida las condiciones en las que se llevaron a cabo las inoculaciones del arroz a lo largo de esta Tesis Doctoral, es decir, células crecidas a una A_{600} de 0,6 y a una temperatura de unos 25 °C. Este planteamiento experimental contrasta con la mayoría de estudios transcriptómicos anteriormente referenciados, en los que se incubaron las bacterias a una temperatura óptima de crecimiento, entre 30 °C y 37 °C, en vez de a la temperatura a la que se realizan los estudios de interacción planta-bacteria (Shidore *et al.*, 2012; Taghavi *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2017). Estas diferencias de temperatura pueden ocasionar un significativo cambio en la expresión génica ya que la temperatura es un factor determinante para la expresión génica en bacterias de la rizosfera (Wu *et al.*, 2011). Por otro lado, en el abordaje realizado en esta Tesis Doctoral las únicas fuentes de carbono y nitrógeno presentes durante la incubación de las bacterias son las aportadas por los extractos vegetales, lo que permite minimizar los efectos negativos sobre la expresión génica que ejercen las fuentes de carbono presentes en los medios de cultivo bacterianos.

El análisis de los datos obtenidos en la transcriptómica en presencia de extractos de arroz reveló una significativa inducción (respecto a la condición control en ausencia de extractos) de una amplia batería de transportadores celulares y bombas de extrusión: transportadores de tipo TRAP de ácidos tricarboxílicos (AzCIB_4712-AzCIB_4716) y dicarboxílicos (AzCIB_0887-AzCIB_0889 y AzCIB_3752-AzCIB_3754), transportadores de tipo ABC de aminoácidos (AzCIB_2307-AzCIB_2320 y AzCIB_3391-AzCIB_3395) y varias bombas de extrusión de tipo RND (AzCIB_1186-AzCIB_1191; AzCIB_2880-AzCIB_2885 y AzCIB_2429-AzCIB_2430). Los exudados radiculares y extractos vegetales son una fuente importante de ácidos orgánicos que pueden, por tanto, activar los transportadores bacterianos y producir un cambio en el metabolismo energético de las bacterias (Eilers *et al.*, 2010). La inducción de este tipo de transportadores ya ha sido descrita en otros trabajos transcriptómicos de bacterias que interaccionan con plantas (Matilla *et al.*, 2007; Shidore *et al.*, 2012; Xie *et al.*,

2015; Zhang *et al.*, 2015; Pankiewicz *et al.*, 2016). Por otro lado, en los extractos vegetales puede haber multitud de compuestos con propiedades antimicrobianas o con posibles efectos perniciosos sobre las bacterias, por lo que la inducción de bombas de extrusión de tipo RND, hasta 3 *clusters* con inducciones de hasta 31 veces (Tabla S1), refleja la adaptación de las bacterias a un ambiente de cambio y más estresante que el medio en el que las células han sido cultivadas. Estas observaciones están en consonancia con las inducciones de bombas de extrusión de tipo RND que habían sido descritas anteriormente en otras bacterias que interaccionan con planta (Matilla *et al.*, 2007; Shidore *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015; Blanco *et al.*, 2016). Además de las bombas de extrusión, también se ha observado la inducción de otros genes relacionados con la respuesta a estrés como los que codifican reguladores de respuesta de las familias TetR (AzCIB_2884, AzCIB_2738 y AzCIB_4444) y AraC (AzCIB_2026), similares a los descritos en bacterias de rizosfera (Ramos *et al.*, 2005; Matilla *et al.*, 2007). Por otro lado, destaca también la inducción (6 veces) del gen AzCIB_3432, similar al gen *osmY* que se induce en condiciones de hiperosmolaridad en otras bacterias (Yim y Villarejo, 1992; Rosso *et al.*, 2008). Aunque no se había reportado previamente la inducción del gen *osmY* en otros estudios transcriptómicos de interacción con planta, sí se había observado la inducción de otros genes y transportadores relacionados con la respuesta al estrés osmótico que se observa en la rizosfera y endorrizosfera (Crozier *et al.*, 2016; Pankiewicz *et al.*, 2016).

En general, en la transcriptómica presentada se observan cambios significativos en la expresión de genes implicados en la degradación de metabolitos secundarios de plantas y que son mayoritarios en los extractos vegetales (Shidore *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Así, por ejemplo, se observó la inducción de genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides (AzCIB_2728-AzCIB_2733) y terpenoides (AzCIB_2440-AzCIB_2444, AzCIB_4439-AzCIB_4444), así como de genes que forman parte de rutas de degradación de otros compuestos aromáticos, como los genes *tod* (AzCIB_4413-AzCIB_4417) de degradación de tolueno, o los genes *pim* (AzCIB_2911-2917) de la degradación de ácidos dicarboxílicos. También se observó la inducción de un conjunto de genes *fad* (AzCIB_4200-4206) relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos (Tabla S1) y cuya inducción había sido reportada previamente en

experimentos de transcriptómica realizados con extractos vegetales (Crozier *et al.*, 2016). Genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos también se vieron afectados, como la inducción de varios transportadores de tipo ABC y de algunas rutas de degradación, la inducción de genes que codifican aminotransferasas, y la represión de otras rutas, como la del metabolismo de la fenilalanina. Alteraciones similares en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos ya se habían descrito en otros estudios transcriptómicos de bacterias que interaccionan con las plantas (Shidore *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015). Debido a la compleja composición del extracto, éste puede actuar como inductor y/o represor en multitud de rutas o incluso en diferentes partes de la misma ruta. Los extractos de arroz también afectaron al metabolismo del nitrógeno. Así, se observó la inducción de genes implicados en la desnitrificación, *e.g.*, los genes *nap* (nitrato reductasa periplásmica), *nor* (óxido nítrico reductasa) y *nos* (óxido nitroso reductasa) (Tabla S1). En este sentido, la desnitrificación ya se había visto inducida en el estudio transcriptómico realizado en *H. seropedicae* colonizando la rizosfera de trigo, relacionando esta inducción con la presencia de compuestos nitrogenados en los exudados (Pankiewicz *et al.*, 2016). La adaptación de los endófitos al uso de compuestos nitrogenados puede suponer una ventaja adaptativa en la rizosfera y endorrizosfera donde existe una alta disponibilidad de este tipo de compuestos. En la transcriptómica realizada en *Azoarcus* sp. BH72 en condiciones de microaerobiosis se observó también la inducción de genes de desnitrificación (Sarkar *et al.*, 2017), aunque en esta bacteria no se observó la inducción de dichos genes en respuesta a exudados radiculares (Shidore *et al.*, 2012). En las condiciones de incubación utilizadas en este trabajo para los estudios de transcriptómica, *i.e.*, baja agitación, la inducción de los genes de desnitrificación puede ser debida a la baja disponibilidad de oxígeno, aunque las condiciones siguen siendo aeróbicas ya que no se observó inducción de los genes implicados en la fijación de nitrógeno, como sí ocurrió en microaerobiosis en *Azoarcus* sp. BH72 (Pankiewicz *et al.*, 2016).

En estudios transcriptómicos previos de interacción planta-bacteria se ha descrito la inducción de genes bacterianos relacionados con las envueltas celulares, *e.g.*, síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, y con la formación de *biofilm* y la adhesión celular (Shidore *et al.*, 2012; Taghavi *et al.*, 2015;

Pankievicz *et al.*, 2016). En este sentido, en *Azoarcus* sp. CIB se ha observado que el extracto de arroz induce la expresión de un *cluster* génico (AzCIB_0814-AzCIB_0826) (Tabla S1, Fig. 35) presuntamente implicado en la síntesis y modificación de un exopolisacárido cuya estructura y función es desconocida hasta la fecha. Entre las especies de *Azoarcus* secuenciadas, el *cluster* inducido por extractos de arroz en la cepa CIB tan solo se conserva en la cepa *Azoarcus* sp. KH32C, si bien alguno de sus genes sí guarda una gran identidad con genes que se habían visto inducidos en la cepa BH72 en presencia de exudados (Shidore *et al.*, 2012). Para confirmar la implicación de este *cluster* en la interacción con la planta se construyó una cepa CIB mutante en el gen *epsF* (Fig. 35). La observación de una morfología de colonia rugosa en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*depsF* (Fig. 36) estaba de acuerdo con la supuesta implicación del *cluster* en la síntesis de un exopolisacárido en *Azoarcus* sp. CIB. Cuando se comparó la colonización del arroz por la estirpe parental (*Azoarcus* sp. CIB) y la mutante en el gen *epsF* se observó que esta última generaba un 36% menos endófitos que la primera, lo que sugería fuertemente que el nuevo *cluster* identificado está ciertamente implicado en alguna de las etapas de interacción con la planta. Aunque resultados similares con pérdida de la capacidad colonizadora se han descrito en mutantes deficientes en la producción de exopolisacárido en la bacteria endófito *G. diazotrophicus* (Meneses *et al.*, 2011), hasta la fecha no se había reportado la implicación de un *cluster* de síntesis de exopolisacáridos en la interacción de *Azoarcus* endófitos con la planta. No obstante, será necesario seguir investigando en el futuro para caracterizar el tipo de exopolisacárido, su mecanismo de síntesis, así como el papel que desempeña en la interacción con la planta.

Al analizar la expresión de genes que han sido relacionados con alguna propiedad PGP, se observó una expresión diferencial en la cepa CIB en presencia de extractos de arroz del gen AzCIB_2320 (40 veces inducido) que codifica una posible indolacetaldehído deshidrogenasa que guarda un 65% de identidad con la proteína codificada por el gen Bphyt_5803 de *B. phytofirmans* PsJN, inducido cuando la bacteria interacciona con patata (Sheibani-Tezerji *et al.*, 2015). En esta bacteria, Bphyt_5803 se ha asociado a la producción de IAA a través de la ruta TSO en la que se oxida la cadena lateral del triptófano (Fig. 4), por lo que se puede

sugerir que la síntesis de IAA en la cepa CIB también tiene lugar mediante la formación de indol-3-acetaldehído como compuesto intermediario y está inducida por los extractos de arroz.

Los estudios de transcriptómica en presencia de extractos de arroz revelan una represión generalizada de los genes implicados en el metabolismo energético de la cepa CIB, tales como los genes que codifican la ATPasa (AzCIB_0085-AzCIB_0089), NADH deshidrogenasas (AzCIB_2984-AzCIB_2991), citocromos (AzCIB_3103-AzCIB_3105) y flavoproteínas (AzCIB_2039-AzCIB_2040) (Tabla S1) y, por otro lado, de los genes que codifican enzimas clave del metabolismo central como la acetil-CoA sintetasa (AzCIB_0750), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (AzCIB_0851), acil-CoA deshidrogenasas (*e.g.*, AzCIB_2038), enzimas del ciclo de Krebs (*e.g.*, malato deshidrogenasa (AzCIB_1872), citrato sintasa (AzCIB_1864) y succinato deshidrogenasa (AzCIB_1867-AzCIB_1868), y proteínas del metabolismo del azufre (AzCIB_0117 y AzCIB_0118) (Tabla S1). Además, la represión del gen AzCIB_3782, que codifica la proteína FtsA involucrada en la división celular, podría indicar una pérdida de la capacidad de duplicación de las células. Estas represiones son en principio sorprendentes, ya que en la mayoría de estudios transcriptómicos realizados en respuesta a exudados y extractos de plantas se observó una inducción de estos mismos genes del metabolismo energético por la riqueza de los derivados vegetales en fuentes de carbono y energía (Sheibani-Tezerji *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015; Crozier *et al.*, 2016; Pankiewicz *et al.*, 2016). Sin embargo, no se puede descartar que las represiones observadas en presencia de extractos de arroz reflejen la presencia de sustancias potencialmente tóxicas para las bacterias que activan mecanismos de detoxificación en detrimento del metabolismo energético. Una posible reducción del metabolismo y la activación de respuestas a estrés sí estaría de acuerdo con lo observado mediante microscopía óptica *in planta* (comentado en el apartado 1) en donde se apreciaba un significativo cambio de morfología celular y la tendencia a la formación de microcolonias como posible respuesta al estrés cuando *Azoarcus* sp. CIB se adapta al ambiente del interior de la raíz (Fig. 15).

El conjunto de estos resultados ha permitido realizar un primer análisis global de las posibles adaptaciones metabólicas que *Azoarcus* sp. CIB debe

realizar durante la transición desde un estilo de vida libre a un estilo de vida de interacción con la planta. En la figura 58 se resumen gráficamente los principales cambios que se han predicho en *Azoarcus* sp. CIB en respuesta a extractos de raíz de arroz, y que deberán ser validados experimentalmente en trabajos futuros.

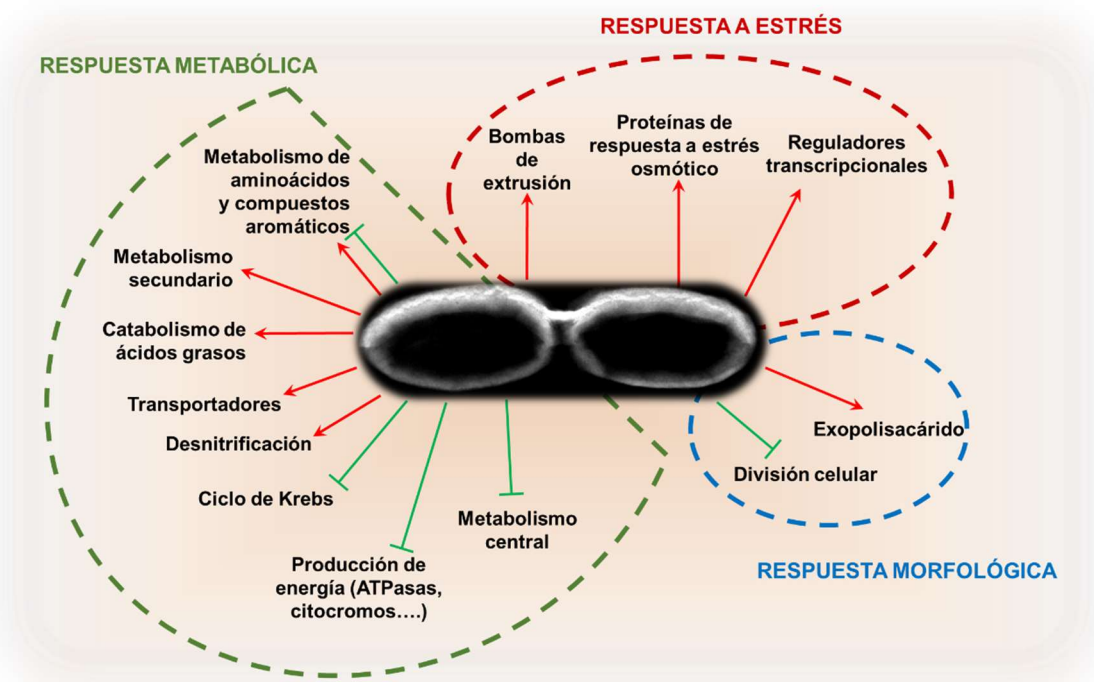


Figura 58. Esquema integrador en el que se representan las principales funciones celulares que podrían estar afectadas por la presencia de extractos de arroz en *Azoarcus* sp. CIB. Las funciones se agrupan en los tres grandes programas de respuesta celular: metabólica, de estrés y morfológica. Se representan con flechas rojas y verdes las funciones que se vieron inducidas y reprimidas, respectivamente.

4.- Efecto de la modificación de los niveles de di-GMPc sobre la capacidad colonizadora de arroz de *Azoarcus* sp. CIB

Hasta la fecha, todos los estudios que han abordado el papel del di-GMPc en las interacciones planta-bacteria se han centrado en relaciones patogénicas o simbióticas, no existiendo trabajos que se centraran en bacterias endófitas. Por ello, en esta Tesis se decidió abordar el estudio del di-GMPc en el establecimiento de *Azoarcus* sp. CIB como endófito.

Para estudiar cómo la variación en los niveles intracelulares del segundo mensajero bacteriano di-GMPc afecta a la capacidad colonizadora del arroz por *Azoarcus* sp. CIB se testaron dos cepas que tienen modificados sus niveles de di-GMPc mediante la sobreexpresión de una PDE que reduce los niveles, *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133), o una DGC que aumenta los niveles, *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) (Martín-Moldes *et al.*, 2016). Como paso previo al estudio de la colonización de arroz, se procedió a comprobar los fenotipos de movilidad y morfología de colonia de las cepas recombinantes respecto a la cepa control con el plásmido vacío. Mientras que la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) mostró una mayor movilidad y la formación de colonias más lisas, la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ4959) mostró una menor movilidad y la formación de colonias más rugosas que la cepa control (Fig. 37). Por lo tanto, los fenotipos obtenidos para cada una de las cepas son consistentes con las observaciones realizadas en otros modelos bacterianos. Así, la sobreexpresión de PDE conlleva, en general, un aumento de la movilidad, promoción del estilo de vida planctónico y formación de colonias lisas (Starkey *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Martín-Moldes, 2014; Aragón *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017), mientras que la sobreexpresión de DGC se traduce en un cambio del estilo de vida móvil al sésil, disminuyendo su movilidad y produciendo un aumento de la síntesis de exopolisacáridos que facilita la formación de *biofilm* y una morfología de colonia rugosa (Simm *et al.*, 2004; Hickman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Starkey *et al.*, 2009; Borlee *et al.*, 2010; Liang, 2015).

Cuando se analizó cómo afectaba la modificación de los niveles de di-GMPc a la capacidad de colonización endofítica de *Azoarcus* sp. CIB, los resultados de interacción con planta mostraron un efecto negativo para el establecimiento de endófitos tanto para la cepa CIB con niveles elevados de di-GMPc como para la cepa CIB con bajos niveles de di-GMPc (Fig. 39). En general, el aumento de los niveles de di-GMPc implica una mayor adhesión, pero disminuye la efectividad de la interacción con planta al disminuir la movilidad mediada por *pili* tipo IV o el flagelo, necesaria para la colonización intracelular (virulencia o fijación de nitrógeno en nódulos), como también sugieren los resultados presentados anteriormente con los mutantes en los *pili* y el flagelo (ver apartado 3.1). Por otro lado, la disminución de la colonización de la endorrizosfera cuando se reducen los niveles de di-GMPc en la bacteria pueden deberse a que, al haberse fomentado

la movilidad bacteriana en detrimento de la adhesión, se haya impedido la formación de *biofilms* y microcolonias en el rizoplaneo como paso previo a la entrada a la endorrizosfera (Fig. 2, ver apartado 2 de la Introducción). En cualquier caso, estos resultados están de acuerdo con las observaciones realizadas en otras bacterias que interactúan con planta (apartado 3.1 de la Introducción) en las que cualquier modificación en la homeostasis del di-GMPc afecta negativamente a la interacción planta-bacteria (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Aragón *et al.*, 2015; Martínez-Gil y Ramos, 2018).

Para tratar de conocer el mecanismo de control mediado por el di-GMPc en los procesos de interacción *Azoarcus*-planta, se analizó si la expresión génica de alguno de los genes implicados en dicha interacción, e.g., *epsF*, *pilY1* y *fliC*, estaba alterada en alguna de las dos cepas mutantes que poseen niveles de di-GMPc más altos o más bajos que la cepa CIB parental. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *pilY1* y *fliC* se veía significativamente reprimida en la cepa que presentaba niveles elevados de di-GMPc (Fig. 38), indicando la existencia de, al menos, un control transcripcional por parte del di-GMPc. La represión de los genes *pil* y *fli* en respuesta a niveles celulares elevados de di-GMPc ya se había observado previamente en otras bacterias como es el caso de *V. cholerae* (Beyhan *et al.*, 2006; Srivastava y Waters, 2012). Es conocido que la disminución de la movilidad mediada por di-GMPc tiene lugar a través de la regulación de la función y/o la biosíntesis de flagelos o *pili* como ocurre con el regulador FleQ en *P. aeruginosa* y *P. putida* (Kazmierczak *et al.*, 2006; Hickman y Harwood, 2008; Molina-Henares *et al.*, 2017), o a través de alteraciones en la maquinaria quimiotáctica afectando a receptores con dominios PilZ (Pitzer *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2013). Dado que en *Azoarcus* sp. CIB no existe un regulador de estos procesos similar al ampliamente estudiado FleQ y, además, tan sólo se ha identificado una proteína con posibles dominios PilZ, es difícil actualmente poder predecir la cascada de señalización implicada en el control transcripcional mediado por di-GMPc de los genes *pil* y *fli* en la cepa CIB.

Por lo que respecta al gen *epsF*, su expresión no se vio significativamente alterada en las dos cepas que presentan niveles más altos o bajos de di-GMPc que la cepa parental (Fig. 38). Para la interpretación de estos resultados es

necesario tener en cuenta que el control mediado por el di-GMPc puede realizarse a diferentes niveles, *i.e.*, transcripcional y/o postranscripcional, siendo el control postranscripcional (por ejemplo uniéndose a motivos proteicos conservados, como los dominios PilZ o los dominios GGDEF y EAL degenerados, *riboswitches* (Römling *et al.*, 2013) o, incluso a dominios no conservados (Martinez-Gil y Ramos, 2018), el más frecuente. Por ello, el hecho de no ver cambios en la expresión del *cluster* del exopolisacárido (significativamente inducido en presencia de extractos de arroz) al variar los niveles de di-GMPc en la célula, no permite descartar que la síntesis proteica o la actividad de las enzimas no se vea afectada por los niveles de di-GMPc ya que la regulación puede realizarse a nivel postranscripcional, como se ha descrito para numerosos exopolisacáridos en diferentes bacterias (Pérez-Mendoza y Sanjuán, 2016). En este sentido, merece la pena destacar que una disminución de los niveles de di-GMPc en la cepa CIB no se tradujo en una inducción de los genes *pilY1* y *fliM* (Fig. 38), lo que sugiere que el aumento de la movilidad de la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZ2133) tiene lugar también a través de un control postranscripcional de los genes correspondientes. Recientemente, un estudio transcriptómico en cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con diferentes niveles de di-GMPc reveló un resultado similar al no haberse reportado diferencias significativas en los niveles de expresión de genes estructurales de los *pili* tipo IV y del flagelo a pesar de haberse observado diferentes fenotipos de movilidad dependiente de los niveles intracelulares de di-GMPc (Lin Chua *et al.*, 2017).

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis han permitido, por primera vez, estudiar cómo la modificación de los niveles intracelulares de di-GMPc en una bacteria endófito afectan a su capacidad de colonización de la planta huésped. Sin embargo, aún se está lejos de poder dilucidar la cascada de señalización involucrada. Para ello, hará falta un estudio pormenorizado a nivel molecular y mediante herramientas ómicas de los diferentes estadios de la colonización del rizoplasma y la endorrizosfera así como de la rutas afectadas por la modificación de los niveles de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIB.

5.- Capacidad de resistencia a metales pesados y metaloides por *Azoarcus* sp. CIB

La acumulación de metales y metaloides tóxicos en el medio ambiente, ya sea por causas naturales o antropogénicas, constituye una grave amenaza para la supervivencia y la salud de los organismos. Es por ello que el estudio de los mecanismos de tolerancia e, incluso, de aprovechamiento energético de estos metales y metaloides desarrollados por muchas bacterias representa un gran reto tanto desde el punto de vista del metabolismo bacteriano como para el desarrollo de herramientas de biorremediación de ambientes contaminados con dichos compuestos (Sparks, 2007; Gadd, 2010). Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral no se habían estudiado los mecanismos de resistencia a metales y metaloides en ninguna cepa del género *Azoarcus*.

Los estudios de resistencia a diferentes metales y metaloides, resumidos en la tabla 10, revelaron una capacidad, hasta la fecha desconocida, de *Azoarcus* sp. CIB que sin duda debía ser estudiada y explorada. Por un lado, se pudo constatar la importante resistencia de la cepa CIB a los metaloides selenio, telurio y arsénico. Como se ha indicado en la Introducción, los mecanismos de resistencia a estos metaloides presentan un gran interés ambiental y biotecnológico, por lo que los mecanismos que determinan estas resistencias fueron objeto de estudio (ver apartados 6 y 7). Por otro lado, el análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB ha permitido la identificación de una isla genómica, isla VII (Fig. 59), en la que se han anotado posibles genes de resistencia a metales pesados tales como cadmio, níquel, zinc, cobalto, cobre, plata y mercurio. Sin embargo, los resultados experimentales han mostrado un comportamiento desigual frente a estos metales pesados, habiéndose confirmado la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a cadmio, níquel y zinc, y su sensibilidad a cobre y mercurio (Tabla 10).

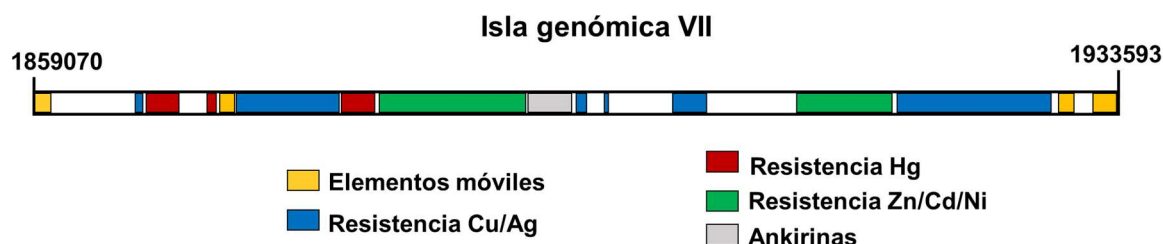


Figura 59. Diagrama esquemático de la isla genómica VII donde se localizan parte de los genes de resistencia a metales en *Azoarcus* sp. CIB. Se representa a escala la región de ~74 kb donde se localizan la mayoría de los genes posiblemente implicados en la resistencia a metales, flanqueada por elementos móviles. En los extremos se muestran las coordenadas de localización en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB.

La resistencia de *Azoarcus* sp. CIB al cadmio, níquel y zinc (MIC de 1,5 mM) es probable que esté mediada por los genes *czc*, que codifican una bomba de extrusión de tipo CBA que ha sido ligada previamente a la resistencia bacteriana a estos metales pesados (Nies, 1995, 2003). Los genes *czc* de la cepa CIB se agrupan en tres *clusters* (Tabla 2), dos de ellos (AzCIB_1685-AzCIB_1693 y AzCIB_1719-AzCIB_1723) localizados en la isla genómica VII (Fig. 59) y otro (AzCIB_1623-AzCIB_1637) localizado en una región cercana. Sin embargo, los valores de la MIC obtenidos en *Azoarcus* sp. CIB no son tan elevados como los descritos para otras bacterias utilizadas como sistemas modelo en el estudio de la resistencia a metales, *e. g.*, *C. metallidurans* CH34 (MIC de 2 a 10 mM) (Legatzki *et al.*, 2003) o el endófito *G. diazotrophicus* PAL 5 (MIC de 1 mM a Cd y 18 mM a Zn) (Intorne *et al.*, 2012). En estas cepas se pudo comprobar la implicación de los genes *czc* mediante estudios genéticos, reportándose que su delección generaba cepas cuya MIC a dichos metales disminuía a 0,2 mM en *C. metallidurans* CH34 (Legatzki *et al.*, 2003), y hacía caer en torno a un 75% la tolerancia de *G. diazotrophicus* PAL5 a Cd y Zn (Intorne *et al.*, 2012). Serán necesarios estudios futuros que permitan confirmar la implicación de los genes *czc* en la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a Cd, Ni y Zn. Además, el estudio de los mecanismos de resistencia podría tener importantes aplicaciones en el uso de *Azoarcus* sp. CIB como herramienta biotecnológica, principalmente en el campo de la fitorremediación, complementando así los estudios preliminares realizados en esta Tesis Doctoral sobre el uso de cepas de *Azoarcus* sp. CIB en sustratos contaminados con cadmio.

El análisis de la isla genómica VII también ofrece una valiosa información para tratar de interpretar la observada sensibilidad de la cepa CIB a mercurio y cobre. Así, algunos *clusters* de resistencia aparecen incompletos o, muy probablemente, no funcionales. Respecto a la resistencia a mercurio solo se han identificado en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB (Tabla 2) los genes *merR* (AzCIB_1669, AzCIB_1680, AzCIB_1681; proteína reguladora), *merT* (AzCIB_1670, AzCIB_1682, transportador) y *merP* (AzCIB_1683, proteína periplásmica de unión a Hg^{2+}), pero no se han encontrado genes ortólogos a *merA* (enzima responsable de la reducción a Hg^0) en ninguna región del genoma. Por lo que respecta a los mecanismos de resistencia al cobre, se han identificado varios *clusters* (Tabla 2; Fig. 59) que podrían codificar dos tipos de bombas de extrusión: (i) genes *cop* (AzCIB_1665 y AzCIB_1712 dentro de la isla genómica VII y AzCIB_1154, AzCIB_3087-AzCIB_3089 y AzCIB_3108 en una región externa) que codifican posibles ATPasas de tipo P, y (ii) genes *cus* (AzCIB_1675-AzCIB_1679, AzCIB_1724- AzCIB_1729, AzCIB_1732 y AzCIB_1733, todos ellos en la isla genómica VII) que codifican una posible bomba de extrusión de tipo CBA (Nies, 2003; Delmar *et al.*, 2015). Dado que en las condiciones de estudio se utilizó como fuente de cobre CuCl_2 , el cual genera cationes divalentes, es posible que los genes *cop* no aporten resistencia en *Azoarcus* sp. CIB en las condiciones testadas, ya que se han asociado predominantemente a la resistencia a iones monovalentes de cobre (Bondarczuk y Piotrowska-Seget, 2013). No obstante, sí se ha reportado la implicación de los genes *cus* en la resistencia a iones de Cu tanto monovalentes como divalentes (Bondarczuk y Piotrowska-Seget, 2013; Delmar *et al.*, 2015; Grass y Rensing, 2001). La localización de gran parte de estos genes *cus* cerca de elementos móviles permite especular con la posibilidad de que estos últimos estén afectando de alguna manera la expresión génica y por ello no se haya podido observar resistencia al cobre. Por ello, resulta necesario en un futuro un estudio más exhaustivo de estos *clusters* que incluya el análisis de su nivel y condiciones de expresión, así como de su regulación.

6.- Estudio de la capacidad de resistencia a selenio y telurio de *Azoarcus* sp. CIB

El selenio y el telurio son dos metaloides con amplio interés tecnológico debido a sus propiedades fotoeléctricas, semiconductoras y tóxicas/nutricionales (Zannoni *et al.*, 2007). Entre sus aplicaciones se ha reportado la utilización del selenio como aditivo nutricional (Rayman, 2008) o en la producción de paneles solares (Dhanjal y Cameotra, 2010) y, especialmente, el uso de SeNPs en terapias anticancerígenas y antimicrobianas, como biosensor o como herramienta de biorremediación de mercurio (Wadhvani *et al.*, 2016). El telurio ha sido ampliamente utilizado como catalizador, en la industria del acero o en la vulcanización del caucho (Ba *et al.*, 2010) y, en los últimos años, la producción de TeNPs ha sido aplicada en diversos campos como el tratamiento del cáncer, como antibacteriano y, especialmente, en el desarrollo de puntos cuánticos con excelentes propiedades fotoconductoras y con una importante proyección para su uso en diagnóstico clínico y la electrónica (Turner *et al.*, 2012).

En esta Tesis Doctoral se han estudiado por primera vez en una bacteria del género *Azoarcus* los mecanismos de resistencia a oxianiones de selenio y telurio, y la capacidad de la bacteria para acoplar su reducción a la formación de nanopartículas cuyo interés industrial, como se ha comentado anteriormente, es elevado (Tinggi, 2008; Zannoni *et al.*, 2008; Ba *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2012).

6.1.- Mecanismos moleculares de resistencia a selenio y telurio en *Azoarcus* sp. CIB

Los resultados del ensayo de resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a selenito revelaron su sensibilidad a este oxianión en condiciones aeróbicas, mientras que, anaeróbicamente, se observó resistencia con una MIC de 8 mM (Tabla 10). Este nivel de resistencia es similar al descrito para otras bacterias resistentes a selenito, *i.e.*, *C. metallidurans* CH34 (6 mM), *Bradyrhizobium japonicum* (6-12 mM), *P. fluorescens* FK-121 y *P. stutzeri* FK-2 y FR-1 (5 mM), *R. palustris* N (8 mM) o *Rhizobium fredii* USDA 201 (6 mM), aunque significativamente menor que el descrito para bacterias con una alta resistencia a selenito, *i.e.*, *Pseudomonas* sp. CA5 (>150 mM), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (200 mM), *Pseudomonas*

moraviensis (120 mM) o *Vibrio natriegens* (100 mM) (Hunter y Manter, 2009; Fernández-Llamosas *et al.*, 2017).

El crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en presencia de una concentración subinhibitoria de selenito (1 mM) permitió analizar las transformaciones químicas producidas, así como la respuesta fisiológica de la bacteria al selenito a lo largo del tiempo (Fig. 40B). En primer lugar, se pudo constatar la toxicidad del selenito, especialmente en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, al observarse una pérdida de viabilidad de dos órdenes de magnitud respecto a la condición control sin selenito. Por otro lado, se pudo determinar mediante ICP-OES que la reducción a selenio se producía a partir de las 72 h de crecimiento, lo que coincidía con el inicio de la fase estacionaria, momento en el que también se observaba la acumulación de un precipitado naranja (Fig. 40A) que se ha asociado, en otras bacterias, a la presencia de selenio elemental (Zannoni *et al.*, 2007; Borghese *et al.*, 2014; Wadhvani *et al.*, 2016). Si bien *Azoarcus* sp. CIB solamente reduce el selenito en fase estacionaria, otras cepas pueden llevar a cabo esa transformación en otras fases del crecimiento (Tabla 12). Así, algunas bacterias son capaces de acoplar la reducción de selenito a selenio al crecimiento celular, observándose la acumulación de selenio en la fase exponencial de crecimiento, *i.e.*, *B. mycoides* Sel TE01 (Lampis *et al.*, 2014), *Shewanella* sp. HN-4 (Tam *et al.*, 2010), *V. natriegens* (Fernández-Llamosas *et al.*, 2017) o *P. putida* KT2440 (Avendaño *et al.*, 2016). Por el contrario, otras bacterias muestran un comportamiento parecido al de *Azoarcus* sp. CIB y solamente reducen el selenito en fase estacionaria, *i.e.*, *R. palustris* N (B. Li *et al.*, 2014) o *P. moraviensis* (Staicu *et al.*, 2015). La base molecular de la bioconversión de selenito en selenio todavía no es bien conocida. En *T. selenatis* se propuso inicialmente la implicación de una reductasa periplásmica, debido a que las cepas mutantes en esta enzima eran incapaces de reducir selenito (DeMoll-Decker y Macy, 1993) y en *S. oneidensis* MR-1, también mediante estudios genéticos, se asoció la reducción de selenito a la acción de la fumarato reductasa periplásmica (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, otros estudios refutan estos resultados, presentando la reducción bacteriana de selenito como un proceso inespecífico llevado a cabo principalmente por grupos tiólicos reducidos, especialmente por glutatión y tiorredoxinas (Debieux *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012; Lampis *et al.*, 2014). Estas

conclusiones se han extraído tanto del análisis proteómico global realizado en *Stenotrophomonas maltophilia* SelTE02 (Antonioli *et al.*, 2007), como del aumento de la expresión de los genes que codifican tiorredoxinas en *B. subtilis* (Garbisu *et al.*, 1999), así como de la pérdida de la capacidad de reducción de selenito al disminuir los niveles intracelulares de glutatión en *R. rubrum* (Kessi y Hanselmann, 2004). En *Azoarcus* sp. CIB, se realizaron una serie de experimentos que han permitido demostrar que la reducción del selenito es llevada a cabo por un componente celular y termolábil (Fig. 41), lo cual permite especular con la implicación de algún componente proteico.

Con el objetivo de intentar dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a selenito cuando *Azoarcus* sp. CIB está creciendo anaeróbicamente, se utilizaron condiciones de crecimiento limitantes en fuente de carbono (piruvato) o aceptor de electrones (nitrato). En ambos casos, solo se observó la reducción del selenito a selenio cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria (Fig. 43). Sin embargo, cuando los cultivos se suplementaban al final de la fase exponencial con fuente de carbono y aceptor de electrones adicionales, se retrasaba la fase estacionaria y se impedía la reducción del selenito (Fig. 43). Estos resultados sugerían que la reducción del selenito tiene lugar solo cuando el estado energético de las células está comprometido. En algunas bacterias como *R. rubrum* se ha propuesto la existencia de algún mecanismo de exportación, dependiente de energía, durante el inicio de la fase exponencial que explicaría que no se acumule selenito en el citoplasma y no se observe reducción de selenito a selenio hasta alcanzar la fase estacionaria (Kessi, 2006). Para tratar de dilucidar si una situación similar podría estar ocurriendo en *Azoarcus* sp. CIB, se añadió a los cultivos un desacoplante de membrana (DNP) que reduce el potencial energético de la célula, observándose la reducción del selenito desde el comienzo de la fase exponencial, así como la consiguiente acumulación de SeNPs intracelulares (Fig. 44). Estos resultados, por lo tanto, son consistentes con la existencia de un mecanismo molecular de resistencia anaeróbica al selenito, muy probablemente secreción, que es dependiente de energía y, por tanto, principalmente activo durante la fase exponencial de crecimiento.

Es interesante destacar que durante la realización de las curvas de crecimiento en presencia de selenito se detectó la aparición de un fuerte olor, similar al del ajo, coincidente con la aparición del precipitado de Se^0 en la fase estacionaria. Tal y como se ha comentado en la Introducción, es conocido que muchas bacterias son capaces de metilar los oxianiones de metaloides como parte de sus mecanismos de resistencia. Estas reacciones rinden formas orgánicas metiladas, tales como DMSe y DMDSe (Stolz *et al.*, 2006; Zannoni *et al.*, 2008), que han sido relacionadas con la aparición del citado olor, el cual clásicamente ha sido utilizado como indicador de la presencia de estos productos metilados (Prigent-Combaret *et al.*, 2012). El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB reveló la existencia de un gen anotado como una posible tiopurina-S-metiltransferasa (AzCIB_0135), que es ortólogo de genes implicados en la metilación de formas orgánicas de selenio y telurio (Ranjard *et al.*, 2002, 2003). Aunque la implicación del gen AzCIB_0135 en el metabolismo y resistencia al selenito en *Azoarcus* sp. CIB es una hipótesis plausible, deberá ser confirmada experimentalmente en estudios futuros.

De acuerdo a los resultados previos descritos en la literatura y a las evidencias experimentales presentadas en esta tesis, los mecanismos propuestos para la resistencia al selenito en las distintas fases de la curva de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB se resumen en la figura 60. En la fase exponencial del crecimiento el principal mecanismo de detoxificación sería la exportación activa del selenito al medio extracelular mediante un sistema dependiente de energía. Dicha exportación debe ser un proceso anaeróbico ya que en condiciones aeróbicas no se observa resistencia al selenito. Por el contrario, las condiciones energéticas menos favorables en la fase estacionaria del crecimiento inducirían la reducción y formación de SeNPs, así como muy probablemente la metilación del Se^0 , cuya acumulación en el citoplasma redundaría finalmente en una pérdida de la viabilidad y lisis celular con la consiguiente liberación de las nanopartículas al medio de cultivo.

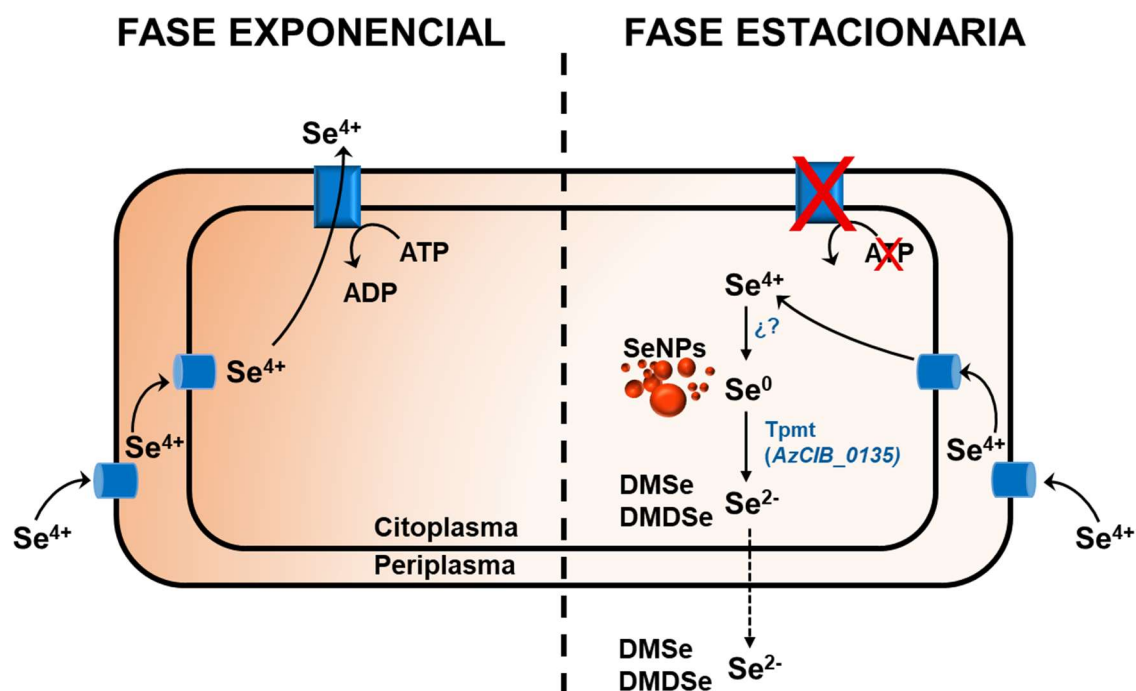


Figura 60. Mecanismos propuestos para la resistencia a selenito en *Azoarcus* sp. CIB. Durante la fase exponencial de crecimiento (izquierda) *Azoarcus* sp. CIB es capaz de resistir el selenito (Se^{4+}) mediante su exportación al medio extracelular a través de un sistema de transporte (hasta la fecha desconocido) dependiente de energía. Cuando *Azoarcus* sp. CIB alcanza la fase estacionaria de crecimiento y, por tanto, se encuentra en condiciones energéticas menos favorables, el sistema de exportación de selenito dejar de ser funcional, se acumula selenito en el citoplasma y se induce la reducción de selenito a Se^0 con la consiguiente formación de SeNPs. Por otro lado, el Se^0 puede ser metilado por la acción de una tiopurina-S-metiltransferasa (Tpmt), posiblemente codificada por el gen AzCIB_0135, formándose las formas volátiles dimetilseleniuro (DMSe) y dimetildiseleniuro (DMDSe) que son liberadas al medio extracelular.

Los resultados observados con el selenito contrastan con las observaciones realizadas durante el estudio de la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a telurito, ya que la resistencia de la cepa CIB parecía ser algo superior en condiciones aeróbicas (Tabla 10). La cinética de la resistencia a telurito, parece seguir un esquema similar al observado en el caso del selenito, ya que la reducción del telurito a telurio sólo tiene lugar a partir de la fase estacionaria de crecimiento, coincidiendo con la acumulación del típico precipitado negro y del fuerte olor a ajo, presumiblemente debido a la metilación del Te^0 a DMTe (Tremaroli *et al.*, 2007).

La comparación de las curvas de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en presencia de selenito o en presencia de telurito permite confirmar que el telurito presenta una mayor toxicidad que el selenito, posiblemente ligado a una mayor

producción de ROS, al observarse un crecimiento más lento y una menor densidad celular final en presencia de telurito. Así, el final de la fase exponencial en presencia de telurito se alcanza a los 3 días, con un incremento del número de células de un orden de magnitud respecto al inicio del experimento (Fig. 47B). Por el contrario, la fase estacionaria se alcanza a las 48 horas en presencia de selenito, con un aumento del número de células de más de dos órdenes de magnitud (Fig. 40B). Además, las células crecidas en telurito (1 mM) presentan severos cambios en su morfología, acortándose su longitud, reduciéndose su capacidad para acumular polihidroxibutirato (PHB) y mostrando una clara tendencia a la agregación respecto al cultivo en ausencia del metaloide (Fig. 61). Estos cambios morfológicos se han descrito previamente en otras bacterias crecidas en presencia de telurito (Rathgeber *et al.*, 2002) y pueden deberse a la cascada de respuesta al incremento de ROS que ejerce el telurito en la célula que implica daños estructurales a nivel de membranas y pared celular (Pérez *et al.*, 2007; Chasteen *et al.*, 2009). Sin embargo, será necesario un estudio detallado y comparativo entre las condiciones de estrés oxidativo derivado de la presencia de telurito frente a condiciones sin metaloide que permitan dilucidar el daño derivado de ROS y los mecanismos de respuesta activados por *Azoarcus* sp. CIB.

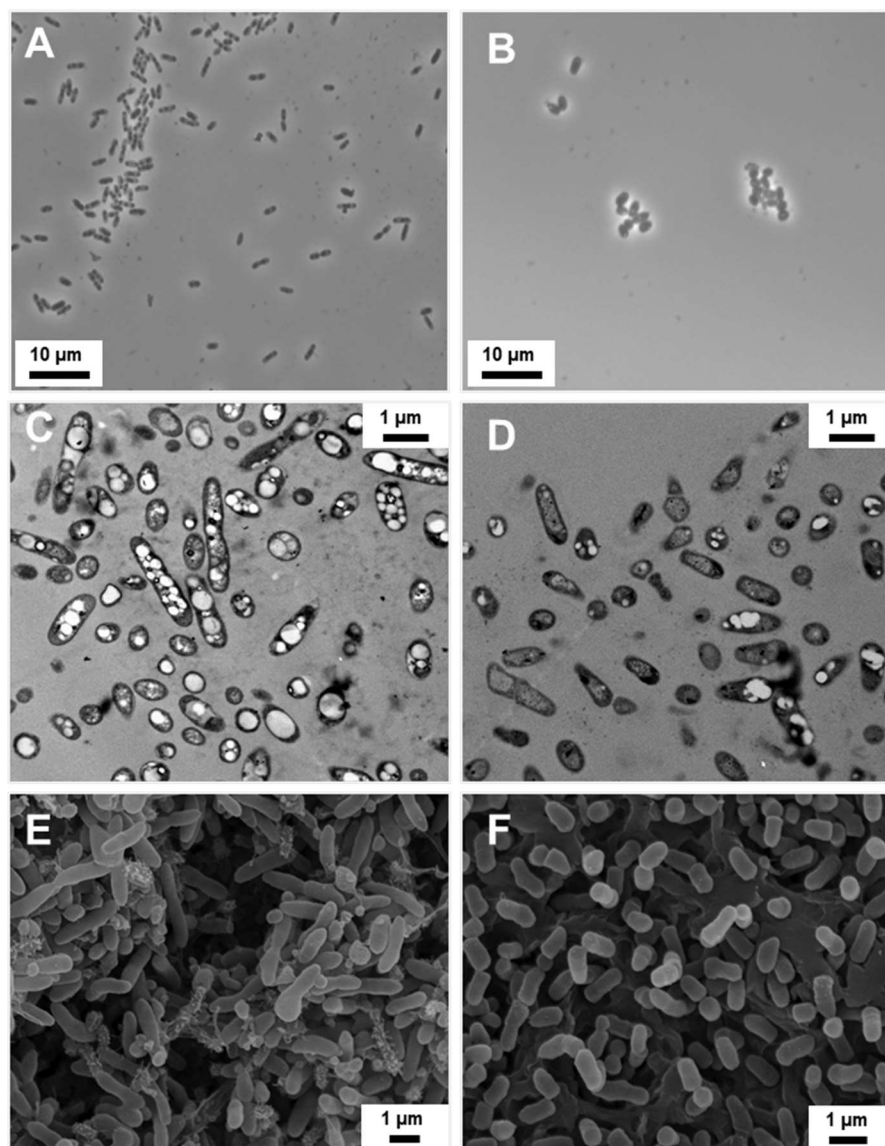


Figura 61. Imágenes de microscopía que muestran células de *Azoarcus* sp. CIB crecidas en presencia o ausencia de telurito. Se muestran células de *Azoarcus* sp. CIB cultivadas en medio MC con piruvato 0,2% (m/v) (paneles A, C y E) frente a células crecidas en medio MC con piruvato 0,2% (m/v) suplementado con telurito 1 mM (paneles B, D y F). En las fotografías superiores (A y B) se muestran imágenes de microscopía óptica. En las fotografías centrales (C y D) se muestran microcortes de inclusiones de *Azoarcus* sp. CIB preparados para TEM, siguiendo el protocolo del apartado 8.2.2 de Materiales y Métodos, en las que se puede observar la acumulación de PHB (gránulos blancos) en el citoplasma. En las fotografías inferiores (E y F) se muestran imágenes de SEM realizadas de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 8.3 de Materiales y Métodos.

6.2.- Análisis de la producción de SeNPs y TeNPs por *Azoarcus* sp. CIB

Como ha indicado más arriba, los estudios sobre la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB para resistir selenito y telurito revelaron la aparición de los característicos precipitados anaranjados y negros asociados a la reducción de estos oxianiones a selenio y telurio elemental, respectivamente. La generación de selenio y telurio elemental en bacterias se había relacionado previamente con la formación de las correspondientes nanopartículas metálicas (Stolz *et al.*, 2006; Nancharaiah y Lens, 2015; Ramos-Ruiz *et al.*, 2016; Staicu *et al.*, 2017). En esta Tesis se profundizó en el estudio de dichas nanopartículas en *Azoarcus* sp. CIB utilizando principalmente técnicas microscópicas.

En primer lugar, es preciso destacar que tanto la producción de SeNPs como la de TeNPs tiene lugar intracelularmente (Fig. 42B y 48B) y ocurre solamente, de acuerdo a lo comentado en el apartado anterior, una vez que el cultivo bacteriano ha entrado en la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 40B y 47B). La liberación de las nanopartículas al medio tiene lugar tras la lisis celular, como puede apreciarse en las imágenes obtenidas por SEM al aparecer las nanopartículas unidas a restos de membranas celulares (Fig. 42C, 48C). De acuerdo al modelo de síntesis de nanopartículas intracelulares descrito previamente por González-Gil y colaboradores (2016) (ver apartado 6.1 de la Introducción), la acumulación de éstas en el citoplasma y la ausencia de mecanismos activos de exportación (Tomei *et al.*, 1995; Gonzalez-Gil *et al.*, 2016) induce la lisis celular y la consiguiente liberación de dichas nanoestructuras metálicas al medio extracelular.

En la tabla 12 se compara la resistencia al selenito y la producción de SeNPs en distintas bacterias. Las SeNPs producidas en la cepa CIB tienen una morfología esférica con un diámetro medio de 88 ± 44 nm (Fig. 42E), lo que se ajusta al tamaño promedio descrito en otras bacterias productoras (Tabla 12), e. g., *R. palustris* N (80-200 nm) (Li *et al.*, 2014) o *P. agglomerans* UC-32, (60-200 nm) (Torres *et al.*, 2012). Las SeNPs de la cepa CIB, según el análisis SAED (Fig. 42F), tienen una naturaleza amorfa, una propiedad común con la de otras SeNPs producidas por bacterias (Nancharaiah y Lens, 2015), y que está de acuerdo con

la aparición de un precipitado naranja indicativo de la formación de selenio elemental con estructura amorfa (frente a su forma cristalina que produce un precipitado gris) (Zannoni *et al.*, 2007).

Tabla 12. Características principales de la producción de SeNPs en algunas bacterias.

Bacteria	Resistencia a Se ⁴⁺	Crecimiento	Tamaño de SENPs	Fase de producción de SeNPs*	Referencia
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	8 mM	Anaeróbico	88±40 nm	Estacionaria (48 h)	(Fernández-Llamas <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. mycoides</i> SelTE01	25 mM	Aeróbico	50-400 nm	Exponencial temprana (5 h)	(Lampis <i>et al.</i> , 2014)
<i>Shewanella</i> sp. HN-41	1 mM	Anaeróbico	11-20 nm	Exponencial media (12 h)	(Tam <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. maltophilia</i> SelTE02	5 mM	Aeróbico	100-300 nm	Exponencial (80 h)	(Lampis <i>et al.</i> , 2017)
<i>R. palustris</i> N	8 mM	Anaeróbico	80-200 nm	Estacionaria (50 h)	(B. Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. moraviensis</i>	120 mM	Aeróbico	ND	Estacionaria (12 h)	(Staicu <i>et al.</i> , 2015)
<i>R. rubrum</i>	1,5 mM	Anaeróbico	ND	Exponencial tardía (70 h)	(Kessi <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. putida</i> KT2440	10 mM	Aeróbico	100-500 nm	Exponencial media (12 h)	(Avendaño <i>et al.</i> , 2016)
<i>V. natriegens</i>	100 mM	Aeróbico	100-400 nm	Exponencial temprana (3 h)	(Fernández-Llamas <i>et al.</i> , 2017)
<i>C. metallidurans</i> CH34	6 mM	Aeróbico	ND	Exponencial tardía (75 h)	(Roux <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. agglomerans</i> UC-32	8 mM	Aeróbico	60-200 nm	ND (15 h)	(Torres <i>et al.</i> , 2012)

* Se indica la fase de crecimiento en la que se observa la producción de SeNPs y, entre paréntesis, el tiempo de incubación del cultivo necesario para observar la aparición de las SeNPs. ND: no determinado.

A diferencia de las SeNPs que han sido ampliamente estudiadas en bacterias, los análisis de TeNPs producidas por bacterias son más escasos y menos detallados ya que durante muchos años la resistencia a telurito se estudió solo con fines antimicrobianos, observándose la aparición de un precipitado negro en cepas resistentes, pero sin detallar la formación de TeNPs y sus características (Fleming, 1932; Rahaman *et al.*, 1986; Pérez *et al.*, 2007; Ba *et al.*, 2010). Al contrario de lo que ocurre con las SeNPs, las TeNPs producidas por *Azoarcus* sp. CIB poseen una morfología de bastón (unos 5 nm de ancho y 200 nm de longitud)

y una naturaleza cristalina (Fig. 47E) similar a la obtenida mediante síntesis química (Kim y Park, 2012). Aunque se ha descrito la formación bacteriana de TeNPs esféricas (Zonaro *et al.*, 2015), la mayoría de estudios reportan la formación, tanto intracelular como extracelular (Baesman *et al.*, 2007), de TeNPs en forma de bastón, similares a las obtenidas con *Azoarcus* sp. CIB (Zare *et al.*, 2012; Ramos-Ruiz *et al.*, 2016). Además de telurio, en el espectro del análisis por EDX de las TeNPs (Fig. 48E) aparecen picos correspondientes a N, P y S que ya habían sido reportados previamente en análisis EDX realizados con otras TeNPs bacterianas (Baesman *et al.*, 2009). La detección de estos elementos podría indicar la presencia de un recubrimiento orgánico durante la formación de las TeNPs que impide su coalescencia y que, de algún modo, guía su estructura.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, y a la vista de los resultados comentados anteriormente, se decidió profundizar en la caracterización y producción de SeNPs con vistas a una posible aplicación biotecnológica de *Azoarcus* sp. CIB para la producción de nanopartículas. De este modo, se realizaron varias pruebas de síntesis de SeNPs bajo diferentes condiciones. Así, se pudo determinar que en condiciones de *resting cell* las bacterias eran capaces de producir SeNPs tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Fig. 45A y C). Aunque el oxígeno parece no afectar a la capacidad de producir SeNPs en condiciones de *resting cell*, de alguna forma sí ha de afectar a su síntesis ya que las SeNPs formadas en presencia de oxígeno fueron significativamente de mayor tamaño (174 ± 36 nm) que las anaeróbicas (90 ± 26 nm) (Fig. 45B y D). Esta observación es importante, ya que algunas de las propiedades de las SeNPs dependen del tamaño de éstas, así por ejemplo se ha demostrado que SeNPs más pequeñas (menores de 100 nm) muestran un mayor efecto antioxidante (Torres *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos con *resting cell* revelan que es posible desarrollar un bioproceso en dos fases, *i.e.*, una primera fase de obtención de suficiente biomasa del biocatalizador cultivado en óptimas condiciones en ausencia del metaloide que causa efectos tóxicos en las células, y una segunda fase de síntesis de las SeNPs a la carta, pudiendo controlar el tamaño de las nanopartículas dependiendo de las condiciones de incubación, *e.g.*, presencia/ausencia de oxígeno (Torres *et al.*, 2012; Fernández-Llamosas *et al.*, 2017).

Aunque la producción de SeNPs mediante *resting cell* es un bioproceso interesante, en ciertas condiciones podría ser deseable la obtención de SeNPs utilizando un bioproceso libre de células. Por ello, se decidió abordar la producción de SeNPs utilizando extractos celulares de *Azoarcus* sp. CIB y comparar dichas nanopartículas con las obtenidas mediante síntesis química con glutatión reducido. Los resultados obtenidos revelaron que es factible la producción de SeNPs con extractos de *Azoarcus* sp. CIB. Además, mientras que los extractos celulares producían SeNPs de forma y tamaño determinado, similares a las obtenidas con células enteras, las SeNPs producidas en presencia de glutatión reducido formaban agregados desestructurados (Fig. 46), similares a los producidos con otros agentes reductores tales como la *L*-cisteína (Li *et al.*, 2010).

En resumen, los resultados presentados en esta Tesis ponen de manifiesto que las SeNPs sintetizadas con *Azoarcus* sp. CIB, o con extractos libres de células, presentan una gran estabilidad y forma definida. Aunque hasta la fecha no se ha podido demostrar la presencia de compuestos orgánicos alrededor de las SeNPs, las evidencias sugieren la presencia de algún agente con función estabilizadora recubriendo las nanopartículas. Al igual que ocurre con el tamaño, la estabilidad es un factor esencial para la actividad de las SeNPs. Se sabe que en dicha estabilidad juegan un papel fundamental algunos elementos celulares, principalmente proteínas. Así, en *T. selenatis* se ha demostrado el papel de la proteína SefA en la estabilización de las SeNPs (Debieux *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012), aunque dicha proteína no ha podido ser detectada en otros organismos. Los estudios proteómicos realizados con SeNPs de origen microbiano han permitido la identificación de algunas enzimas, e.g., alcohol deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, isocitrato liasa, y porinas de membrana externa (Dobias *et al.*, 2011; Gonzalez-Gil *et al.*, 2016; Lampis *et al.*, 2017), posiblemente involucradas en la estabilización de las nanopartículas ya que la presencia de estas enzimas durante la síntesis química de SeNPs afecta positivamente su estabilidad y morfología (Dobias *et al.*, 2011; Tugarova y Kamnev, 2017).

Aunque la síntesis bacteriana de SeNPs es muy prometedora aún quedan por dilucidar varios aspectos importantes que permitan su producción y uso a gran escala. Principalmente, se ha de abordar la necesidad de poder controlar el

tamaño de las SeNPs sintetizadas y poder acortar tiempos de producción, que suelen ser largos debido a la toxicidad del selenito (Tugarova y Kamnev, 2017). Aun así, la síntesis bacteriana de SeNPs posee varias ventajas sobre la síntesis química como es el hecho de una producción ecológicamente sostenible, la mayor estabilidad, abordada anteriormente, y la biocompatibilidad de las nanopartículas. En este último aspecto, recientemente se ha demostrado en ensayos con embriones de pez cebra una menor toxicidad de las SeNPs de origen orgánico frente a las de síntesis química (Mal *et al.*, 2017). Es importante también recordar aquí que, además de la síntesis bacteriana de SeNPs, hay un extenso trabajo sobre su bioproducción en otros organismos tales como los hongos, levaduras, algas y plantas (Shoeibi *et al.*, 2017). Aunque las bacterias presentan, en general, una mayor resistencia a selenito y ofrecen importantes ventajas en cuanto a su manejo y a la aplicación de técnicas moleculares, la combinación de diferentes estrategias de síntesis utilizando distintos organismos puede tener importantes aplicaciones futuras (Shoeibi *et al.*, 2017; Tugarova y Kamnev, 2017). Por ejemplo, debido al estrecho margen que separa las propiedades beneficiosas del selenio de las tóxicas, se ha propuesto el estudio de consorcios planta-bacteria tanto para su uso en estrategias de fitorremediación de suelos ricos en selenio como para el desarrollo de alimentos funcionales con una mayor riqueza en selenio (Schiavon y Pilon-Smits, 2017). Finalmente, además de todas las posibles aplicaciones biotecnológicas que se han ido comentando a lo largo de ese trabajo, el estudio de la resistencia bacteriana a los oxianiones de selenio y la producción de SeNPs resulta de un gran interés ambiental por sí mismo debido a su rol en el ciclo biogeoquímico del selenio.

Por todo ello, el conjunto de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral relativos a la síntesis de nanopartículas por *Azoarcus* sp. CIB, sienta las bases para una futura línea de investigación muy interesante desde el punto de vista biotecnológico y biomédico que permita la obtención de SeNPs (y TeNPs) con forma y propiedades determinadas mediante la optimización de diferentes sistemas de producción basados en cultivos celulares, *resting cell* o extractos celulares. Además, la capacidad de *Azoarcus* sp. CIB de vivir como endófito de plantas podría en un futuro permitir el desarrollo de importantes herramientas en

el campo de la fitorremediación o para el desarrollo de alimentos funcionales ricos en selenio.

7.- Resistencia a arseniato y arsenito por *Azoarcus* sp. CIB

Al contrario de lo reportado para el selenio y el telurio, la resistencia bacteriana a especies de arsénico se encuentra bien documentada y sus determinantes genéticos han sido caracterizados. Como ya se ha indicado en el apartado 7 de la Introducción, los genes implicados en los mecanismos de resistencia a especies arsenicales son: *ars* (resistencia a arseniato), *arr* (respiración de arseniato), *aio* (resistencia y/o utilización de arsenito como fuente de energía en condiciones aeróbicas) y *arx* (utilización de arsenito como fuente de energía en condiciones anaeróbicas) (Andres y Bertin, 2016). En muchos microorganismos las agrupaciones génicas de resistencia a arsénico se encuentran en islas genómicas, cercanas a elementos móviles (Fernández *et al.*, 2014) o en plásmidos movilizables (Andres *et al.*, 2013; Freel *et al.*, 2015), lo cual es indicativo de que la diseminación de estos genes por transferencia horizontal ha debido tener una gran importancia a lo largo de la evolución microbiana. Además, la amplia distribución de estos genes entre bacterias muy alejadas filogenéticamente es un reflejo del papel biológico que la resistencia a arsénico puede jugar como: (i) mecanismo de adaptación a ambientes altamente contaminados por arsénico, como acuíferos o lagos alcalinos, e.g., lago Mono de California (0,2 mM arsénico) o el lago Searles (hasta 3 mM arsénico) (Oremland, Stolz, *et al.*, 2004); (ii) vestigio de la atmósfera primogenia anoxigénica con altos niveles de arsénico (Stolz *et al.*, 2010); (iii) método de supervivencia y competencia bacteriana frente a la predación por protistas en una especie de “guerra química” (Hao *et al.*, 2017).

Dado que hasta la fecha no se habían realizado estudios específicos sobre la resistencia a arsénico y los mecanismos moleculares implicados en bacterias del género *Azoarcus*, se decidió investigar estos aspectos en la cepa CIB.

7.1- El *cluster ars* está implicado en la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a arseniato/arsenito

Azoarcus sp. CIB posee un único *cluster ars* con una organización génica (*arsRCDAB*) (Fig. 49) que contrasta con la de otras especies de su género, como *Azoarcus* sp. BH72 y *A. olearius* DQS-4, que poseen una duplicación del gen *arsC* (codificante para la arseniato reductasa) dentro del propio *cluster* (Krause *et al.*, 2006) (Fig. 49), u otras bacterias altamente resistentes a arsénico, como *P. putida* KT2440, que contienen dos *clusters ars* completos (Páez-Espino *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014). Además, el análisis del genoma de la cepa CIB no ha permitido identificar ningún gen presuntamente relacionado con la metilación de especies arsenicales, como el gen *arsH* presente en el genoma de *P. putida* KT2440 (Páez-Espino *et al.*, 2009) y que, recientemente, se ha reportado en el genoma de dos cepas del género *Azoarcus*, *i.e.* *Azoarcus* sp. SY39 (Nº de acceso GCA_002869045.1) y una cepa detectada en un estudio metagenómico (Nº de acceso PRJNA387015).

En diferentes especies bacterianas se ha descrito la existencia de una o varias arseniato reductasas accesorias, diferentes a las codificadas en el *cluster ars*, y cuyos genes están repartidos por diferentes regiones del genoma (Fernández *et al.*, 2014). En este sentido, el análisis detallado del genoma de *Azoarcus* sp. CIB también reveló la presencia de una segunda arseniato reductasa, gen *arsC2*; y en *Azoarcus* sp. BH72 hemos identificado hasta tres posibles genes que codifican arseniato reductasas (*Azo_0525*, *Azo_1658*, *Azo_2067*). Todas estas posibles arseniato reductasas accesorias en *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. BH72 presentan una baja identidad de secuencia entre ellas y pertenecen a la familia de las reductasas dependientes de glutarredoxina, en contraste con las arseniato reductasas codificadas en el *cluster ars* que pertenecen a la familia de las reductasas dependientes de tiorredoxina. Estas observaciones podrían sugerir que la adquisición de los genes *ars* accesorios ha tenido lugar a través de eventos evolutivos diferentes a la adquisición del *cluster ars*. Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados con arseniato reductasas se han llevado a cabo exclusivamente con las proteínas codificadas en los *clusters ars*, habiendo pasado las arseniato reductasas accesorias

prácticamente desapercibidas en la mayoría de las publicaciones y revisiones. Sin embargo, la distribución de los genes *ars* accesorios parece ser relativamente común y su función importante durante la adaptación de las bacterias a ambientes con presencia de arsénico. Así, en *P. putida* KT2440 la identificación de arseniato reductasas codificadas fuera de los *clusters ars* se ha relacionado con la regulación (ver más abajo) (Fernández *et al.*, 2014) y en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha demostrado el papel complementario de estas arseniato reductasas, junto con la codificada en el *cluster ars*, en la resistencia a arseniato (Lopez-Maury *et al.*, 2009).

Para poder dilucidar la implicación de ambas arseniato reductasas en la resistencia a arseniato en *Azoarcus* sp. CIB se realizaron estudios comparativos de resistencia a arseniato en las cepas mutantes en *arsC* o *arsC2* respecto a la resistencia de la cepa silvestre. Las cepas de *Azoarcus* sp. CIB mutantes en los genes *arsC* y *arsC2* mostraron una significativa pérdida de la resistencia a arseniato, en torno al 33% y 50%, respectivamente, respecto a la cepa silvestre (Tabla 11). Estos resultados confirman que ambas arseniato reductasas son funcionales y sugieren la existencia de una relación sinérgica que determina un alto nivel de resistencia al arseniato (MIC de 150 mM; Tabla 10). La inactivación del gen *arsB*, que presuntamente codifica una bomba de extrusión del arsenito producido, generó una reducción en el nivel de resistencia a arseniato del 66% y 50%, dependiendo de si el experimento se realizaba en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, respectivamente (Fig. 51). Este resultado revela el papel fundamental que la extrusión del arsenito producido tiene para la viabilidad celular, y que ya había sido previamente reportado en otras bacterias, al observarse una mayor sensibilidad a arseniato en cepas mutantes en *arsB* respecto a los mutantes en *arsC* (López-Maury *et al.*, 2003). Sin embargo, queda por dilucidar si pueden existir en *Azoarcus* sp. CIB mecanismos de extrusión alternativos, tal vez menos eficientes, que explicarían que la bacteria sea capaz de seguir resistiendo parcialmente arseniato aún con el gen *arsB* mutado.

El análisis de expresión de los genes *arsC* y *arsC2* realizado mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 52), permitió obtener información sobre su regulación en *Azoarcus* sp. CIB. Así, se observó que el gen *arsC2* parece tener una expresión

constitutiva, mientras que el gen *arsC* presenta una significativa inducción en presencia de arsenito y, sobre todo, en presencia de arseniato. La inducción de *arsC* en presencia de arseniato o arsenito, junto con el hecho de que exista un gen *arsR* en el cluster *ars* de *Azoarcus* sp. CIB, sugiere que la regulación de dicho cluster es similar a la ya descrita para otros clusters *ars* dependientes de la proteína ArsR. ArsR es un represor dimérico que se une a la región operadora del cluster *ars* y solo en presencia de arsenito, pero no de arseniato, se disocia permitiendo la transcripción de los genes *ars* (Wu y Rosen, 1993; Shi *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2009; Saltikov, 2011). Sin embargo, la transcripción de los genes *ars* puede ser inducida tanto por arsenito como por arseniato debido a: (i) la expresión basal de *arsC* genera cantidades suficientes de arseniato reductasa como para producir concentraciones inductoras de arsenito (Zhang *et al.*, 2009); (ii) la presencia de arseniato reductasas accesorias (como *arsC2* en *Azoarcus* sp. CIB) de expresión constitutiva facilita la reducción inicial del arseniato a arsenito que actúa como inductor del cluster *ars* (Lopez-Maury *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014). En este sentido, la expresión constitutiva de *arsC2* en *Azoarcus* sp. CIB facilitará la inducción del cluster *ars* cuando las células se cultivan en presencia de arseniato.

El estudio de las secuencias y estructuras de proteínas ArsR ha permitido determinar la presencia de residuos de cisteína conservados e implicados en la unión al inductor (arsenito). Así, las proteínas ArsR de *E. coli*, *S. aureus* o *Shewanella* sp. ANA-3 presentan en su dominio N-terminal la secuencia Cys³²-X-Cys³⁴ responsable de la unión a arsenito (Murphy y Saltikov, 2009; Saltikov, 2011; Shen *et al.*, 2013). Sin embargo, las proteínas ArsR de otras bacterias, como es el caso de *C. metallidurans* CH34, poseen tres cisteínas presumiblemente implicadas en la unión a arsenito en el dominio C-terminal (Zhang *et al.*, 2009). En la figura 62 se muestra un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ArsR de diferentes bacterias incluyendo las de cepas de *Azoarcus*. Como se deduce del estudio comparativo, la proteína ArsR de *Azoarcus* sp. CIB, y de las demás especies el género analizadas, presentan los residuos de cisteína presuntamente implicados en la unión a arsenito en su extremo C-terminal, guardando así una mayor similitud con el represor ArsR de *C. metallidurans* CH34. Además del lugar de unión del arsenito a la proteína, en

algunas bacterias, e.g., *E. coli*, se ha identificado la secuencia consenso TCATNNNNNNNTTTG como la caja operadora de unión de ArsR al promotor del *cluster ars* (Xu *et al.*, 1996; Saltikov, 2011). En otras bacterias, tales como *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Campylobacter jejuni* o *B. subtilis* la secuencia de la caja operadora ArsR es ATCAANNNNNNNTTGAT (López-Maury *et al.*, 2003). Por el contrario, ninguna de las anteriores cajas operadoras ArsR se han identificado en los promotores *ars* de *S. aureus* (Saltikov, 2011), *C. metallidurans* CH34 (Zhang *et al.*, 2009) o *P. putida* KT2440 (Páez-Espino *et al.*, 2015). Un estudio detallado de la región promotora del *cluster ars* en *Azoarcus* sp. CIB tampoco ha permitido identificar ninguna de las secuencias consenso descritas.

```

Azoarcus sp. CIB    ---MDEKAAVA--VFECSSGVRLGVFRLLVKAEPAGIVAGDIATALDIAPSSLSFHLRT
Azoarcus sp. KH32C MSTIQKDQVLR--VFEALSSGVRLDVFRLLVQAGNGGRVAGEIGAALDIPPTNLSFHLKA
"A. aromaticum" EbN1 ---MDQKSALA--VFESLSSGVRLDVFRLLVKAEPAGIVAGDIATALDIAPSSLSFHLRT
Azoarcus sp. BH72  ---METLNAAE--LLAALGHETRLSIFRLLVEAGFAGLNASAIGEHLSLAPATLSFHLAH
C. metallidurans CH34 ---METENALE--ALAALAHGIRLAVFRLLVQAGPEGLPAGRIAELEMPASSLSFHLKE
E. coli (R773)     ---MTYKELAT--YLVLSDSRLEILDLLSCGE---LCACDLEHFQFSQPTLSYHMKA
Shewanella sp. ANA-3 ---MKQRIIVKANIFKALGHPTRLWMVEQLAQGE---KCVCEFEVGVVDVDFSTISKHLSV
S. aureus          ---MLQLTPLQ--LFKNLSDETRLGIVLLREMGEE--LCVCDLCMALDQSQPKISRHLAM
                  :          : * . ** : . *          . : .. :.* *:

Azoarcus sp. CIB    MTQAGLLRVEQEGRFLRYRANLALMTEVVGFLTENCCSGVPGGCRD----GDILSGGIPG
Azoarcus sp. KH32C  LVQAGLLSVEQEGRYQRYRASIPMLDTIAYLTANCCGDHPEECAEYRDRVPALDGFLPP
"A. aromaticum" EbN1 LTQAGLLTVEQEGRFLRYRANLSLMAEVIGFLTENCCAGVPERCAA----VCDVEAQIAD
Azoarcus sp. BH72  LSRVGLIVGERESRFIHSARFDTMDELIAFLTRNCCQGSAA--CLP-----KTAG
C. metallidurans CH34 LHRAGLLASRQEGRSIIYMAQFETMNALLGYLTENCCGGAP--CSP-----VSS
E. coli (R773)     LVKTNLVTTRKIGNKHLYQLNHNIFESVINNLSKVHTSNQRCICHN-----LKA
Shewanella sp. ANA-3 LRHAGIVDMEKRGKQIFRYLTMPCLMTSLHCIDGLL-----DLQIQKQIAL
S. aureus          LRESGILLDRKQGGKVVHRYLSPHIPSWAAQIIIEQAWLSQQDD-----VQVIARKLAS
                  :   : :   . . . *          :

Azoarcus sp. CIB    CGSSNPARESKA----
Azoarcus sp. KH32C  LSCSADGGCKK-----
"A. aromaticum" EbN1 CSGSRGTGTEPRA---
Azoarcus sp. BH72  CDTTAKRRAATDKDSA
C. metallidurans CH34 CSVATES-----
E. coli (R773)     GEC-----
Shewanella sp. ANA-3 IE-----
S. aureus          VNCSGSSKAVCI----

```

Figura 62. Comparación de secuencias de la proteína ArsR y localización de los residuos de cisteína implicados en la unión de arsenito. Las secuencias de aminoácidos del regulador transcripcional ArsR de *Azoarcus* sp. CIB (WP_050414989.1), *Azoarcus* sp. KH32C (WP_015451702.1), "*A. aromaticum*" EbN1 (CAI08964.1), *Azoarcus* sp. BH72 (CAL94969.1), *C. metallidurans* CH34 (ABF07219.1), *Shewanella* sp. ANA-3 (ABK48580.1), *E. coli* (R773) (P15905.1) y *S. aureus* (AAP32347.1) fueron alineadas usando el programa de alineamiento múltiple de secuencias *ClustalW*. Los residuos de aminoácidos de cada secuencia se muestran con el código estándar de una sola letra. En rojo y azul se indican los residuos de cisteína posiblemente implicados en la unión a arsenito en los dos subgrupos de proteínas ArsR.

Aunque los resultados presentados en esta tesis permiten proponer por primera vez un modelo de la resistencia al arseniato y la regulación de los genes *ars* en bacterias del género *Azoarcus*, estos estudios deberán ser complementados en el futuro con abordajes bioquímicos y genéticos sobre la proteína ArsR purificada, su inductor(es) específico y su interacción con la región promotora *ars*.

7.2- Implicación del *cluster arx* en la utilización de arsenito como fuente de energía en *Azoarcus* sp. CIB

Los estudios de resistencia a arsenito revelaron que la MIC de este compuesto en *Azoarcus* sp. CIB es de 1,5 mM en condiciones anaeróbicas y de 1 mM en condiciones aeróbicas (Tabla 10). Aunque estos valores se encuentra lejos de los de especies altamente resistentes como *Achromobacter arsenitoxydans* SY8 (18 mM) (Li *et al.*, 2012) o *P. putida* KT2440 (8 mM) (Fernández *et al.*, 2014), es similar al de muchas otras bacterias ambientales aisladas de medios contaminados con arsenito y pertenecientes a diversos géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Bacillus* (Liao *et al.*, 2011). Por otro lado, el análisis del genoma de la cepa CIB reveló la presencia de un *cluster* de genes presuntamente involucrados en el metabolismo del arsenito, en concreto los genes *arx* que podrían codificar una arsenito oxidasa anaeróbica. Esta observación resultó especialmente llamativa ya este *cluster* sólo había sido identificado previamente en microorganismos quimiolitotrofos que poseen la capacidad de obtener electrones para su metabolismo energético a partir del arsenito. Por ello, en esta Tesis Doctoral se decidió abordar la caracterización del presunto *cluster arx* en *Azoarcus* sp. CIB.

La enzima responsable de la oxidación anaeróbica del arsenito es un heterodímero de unión a membrana y orientado hacia el periplasma que está formado por una subunidad grande (ArxA) y otra subunidad pequeña (ArxB) (Zargar *et al.*, 2012). El resto de genes del operón catabólico *arx* codifican las proteínas ArxC, proteína transmembrana relacionada con las interacciones redox con quinonas durante la transferencia de electrones, y ArxD, chaperona citoplasmática. Como ya se ha detallado en el apartado 7 de la Introducción, los tres tipos de enzimas implicadas en el metabolismo energético del arsénico en

bacterias, *i.e.*, arseniato reductasas respiratorias (codificadas por los genes *arrA*), arsenito oxidasas aeróbicas (codificadas por los genes *aioA*) y arsenito oxidasas anaeróbicas (codificadas por los genes *arx*), son molibdoenzimas pertenecientes a la familia de las DMSO reductasas. Se ha observado que existe una mayor identidad y cercanía filogenética entre las subunidades catalíticas de las arseniato reductasas respiratorias (ArrA) y las arsenito oxidasas anaeróbicas (ArxA) que entre éstas y las arsenito oxidasas aeróbicas (AioA) (Fig. 63). De hecho, los genes *arx* han sido los últimos en ser caracterizados y su descubrimiento se realizó empleando sondas de los genes *arrA*. Anteriormente a este descubrimiento se llegó a plantear la posibilidad de que existiesen arseniato reductasas capaces tanto de reducir arseniato como de realizar la reacción inversa, oxidando el arsenito a arseniato, en ausencia de oxígeno (Zargar *et al.*, 2010).

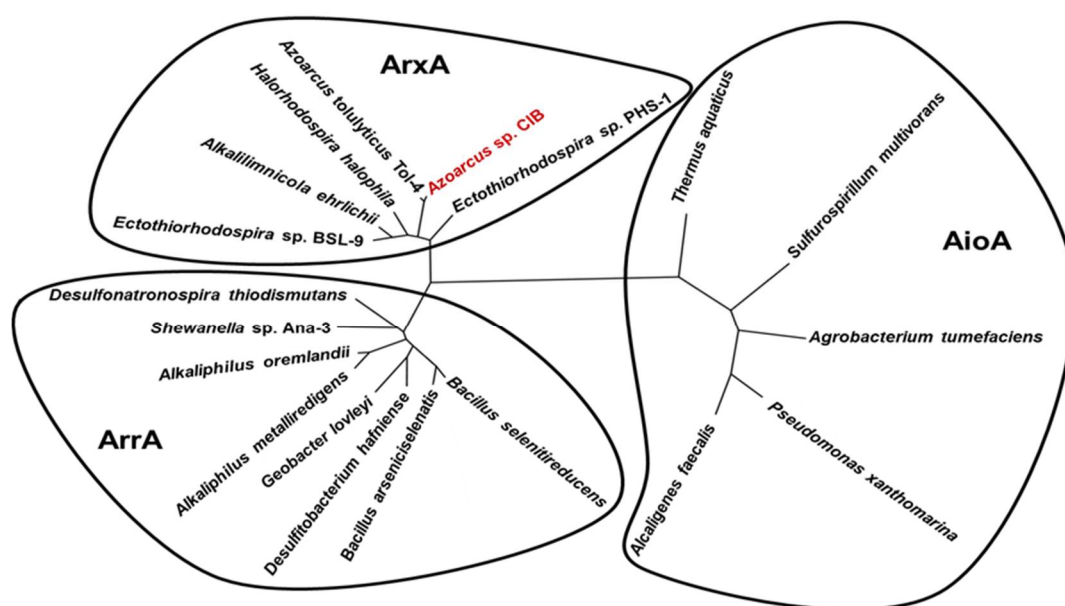


Figura 63. Filograma de las proteínas ArxA, AioA y ArrA del metabolismo energético del arsénico. Se muestra la distribución filogenética de la proteína ArxA en las bacterias actualmente secuenciadas que presentan el *cluster arx* (en rojo se señala la enzima ArxA de *Azoarcus* sp. CIB). En el filograma, además, se representa la distribución de las proteínas AioA (arsenito oxidasa aeróbica) y ArrA (arseniatoreductasa respiratoria) de algunas bacterias representativas. A continuación, se detallan los números de acceso de las proteínas analizadas: *Azoarcus* sp. CIB (WP_050415005.1), *A. tolulyticus* Tol-4 (WP_076602992.1), *H. halophila* (WP_011813170.1), *A. ehrlichii* (WP_011627967.1), *Ectothiorhodospira* sp. BSL-9 (WP_063465591.1), *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1 (WP_008932021.1), *D. thiodismutans* (WP_008871035.1), *Shewanella* sp. ANA-3 (WP_011717272.1), *A. oremlandii* (WP_012158954.1), *A. metalliredigens* (WP_012062249.1), *G. lovleyi* (WP_012469220.1), *D. hafniense* (WP_015943299.1), *B. arseniciselenatis* (WP_071313526.1), *B. selenitireducens* (WP_013173528.1), *T. aquaticus* (WP_053768293.1), *S. multivorans* (WP_025346171.1), *A. tumefaciens* (WP_003518815.1), *P. xanthomarina* (WP_041015811.1) y *A. faecalis* (WP_003804071.1).

Los *clusters arx* descritos hasta la fecha están muy conservados en todas las especies bacterianas estudiadas (Fig. 53). El análisis de la subunidad catalítica de la presunta arsenito oxidasa, ArxA, de *Azoarcus* sp. CIB reveló un 60% de identidad de secuencia con la de especies que no están filogenéticamente próximas tales como *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1, *Ectothiorhodospira* BSL-9 o *A. ehrlichii* MLHE-1. Estas bacterias, además, presentan metabolismos claramente diferenciados ya que, aunque ambas han sido aisladas de un lago alcalino con una alta presencia de arsénico, *A. ehrlichii* MLHE-1 es un quimioautótrofo anaeróbico facultativo mientras que las cepas de *Ectothiorhodospira* spp. son fotoautótrofos anaeróbicos (Zargar *et al.*, 2010). Hasta la fecha solo se ha podido demostrar la funcionalidad de esta arsenito oxidasa en las cepas *A. ehrlichii* MLHE-1 y *Ectothiorhodospira* sp. BSL-9, al no haberse podido realizar estudios *in vivo* en la cepa *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1 por dificultades técnicas (Zargar *et al.*, 2010; Hernández-Maldonado *et al.*, 2017; Oremland *et al.*, 2017). Aunque los genes *arx* solo se han encontrado mediante análisis bioinformáticos en un reducido número de bacterias con genomas secuenciados, el análisis de las secuencias metagenómicas depositadas en los bancos de datos indica que su abundancia es mayor de lo que se pensaba en un primer momento, al menos en ambientes con presencia de arsenito (Hernández-Maldonado *et al.*, 2017; Kurth *et al.*, 2017), identificándose en bacterias adaptadas a ambientes extremos, generalmente hipersalinos, como *Thiocapsa* spp., *Thioalkalivibrio* spp. y *Halomonas* spp (Oremland *et al.*, 2017). Aunque existen referentes previos de cepas autótrofas del género *Azoarcus*, cuyos genomas no han sido secuenciados, en las que se reportó su capacidad de oxidar arsenito anaeróticamente, *i. e.*, *Azoarcus* sp. DAO1 (Rhine *et al.*, 2006), *Azoarcus* sp. EC1-pb1 y *Azoarcus* sp. EC3-pb (Sun *et al.*, 2009), resulta paradójico detectar la presencia de un presunto *cluster arx* en una cepa heterótrofa y sensible a pH básicos como es *Azoarcus* sp. CIB. Utilizando los genes *arx* de la cepa CIB como sonda, se han identificado también ortólogos en el genoma del heterótrofo *A. tolulyticus* Tol-4 (Nº de acceso: PRJNA329869). Curiosamente, el contenido G+C de los genes *arx* de la cepa CIB es sensiblemente mayor que el del resto del genoma (68,7% frente a 65,8%) y en posición 3' al último gen del *cluster* (*arxD*) se localiza una integrasa fágica y, a continuación, un conjunto de elementos móviles y transposasas, que forman parte

de la denominada isla genómica V (Martín-Moldes *et al.*, 2015) (Fig. 64), adyacente al *cluster ars*. Si embargo, no han podido detectarse estos elementos móviles en el genoma de *A. tolulyticus* Tol-4. Estas observaciones sugieren que los genes *arx* de *Azoarcus* sp CIB se obtuvieron por transferencia horizontal desde otra especie bacteriana en un suceso relativamente reciente en la evolución de la cepa CIB. Con el objetivo de profundizar en el origen evolutivo de los genes *arx* en el género *Azoarcus*, sería muy interesante la secuenciación de alguna de las cepas autótrofas capaces de oxidar arsenito para así poder realizar estudios comparativos de los *cluster arx* en cepas con diferentes estilos metabólicos.

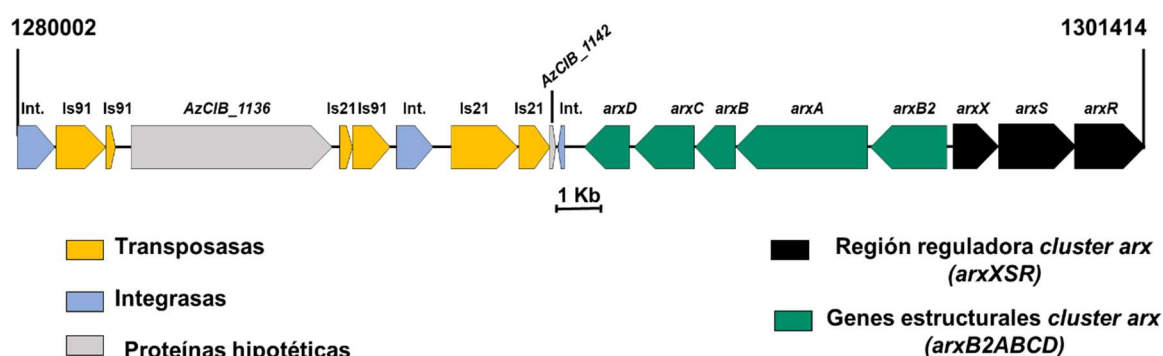


Figura 64. Esquema de la región cromosómica que engloba al *cluster arx* en *Azoarcus* sp. CIB. El diagrama representa, a escala, la arquitectura de la isla genómica V del cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB que contiene el *cluster arx* y una región rica en elementos móviles. En los extremos se muestran las coordenadas de localización en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB. En la parte superior se indica el nombre de cada gen o, en el caso de las transposasas, la familia a la que pertenecen.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral permiten analizar por primera vez la utilización de arsenito como fuente de energía, en condiciones anaeróbicas, mediante la utilización de los genes *arx* en un organismo heterótrofo. Esta capacidad energizante del arsenito se reflejó en un incremento del crecimiento del 10-20% cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultivaba anaeróbicamente en condiciones subóptimas (piruvato 0,1%) de fuente de carbono respecto al crecimiento observado en ausencia de arsenito (Fig. 54A). Este incremento del crecimiento llegó a ser del doble cuando se utilizó una fuente de carbono poco energética como el benzoato (Fig. 54B). Estos resultados coinciden con

observaciones similares de utilización del arsenito como fuente de energía que se han reportado en especies fotoautótrofas, provenientes de colecciones de cultivo, del género *Ectothiorhodospira* (Hoeft-McCann *et al.*, 2016). Curiosamente, estas cepas pese a ser autótrofas sólo fueron capaces de aumentar su crecimiento en torno a un 10-20% en presencia de arsenito, perdiendo la capacidad de utilizarlo como única fuente de energía, al contrario que cepas aisladas directamente de ambientes contaminados como *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1 y *Ectothiorhodospira* sp. BLS-9 (Hoeft-McCann *et al.*, 2016). En *Azoarcus* sp. CIB el gen *arxA* parece estar también relacionado con la resistencia a arsenito, ya que la cepa mutante en *arxA* veía reducida su capacidad de resistencia a arsenito a 0,2 mM. No obstante, hasta la fecha aún no se ha podido detectar la producción de arseniato como producto de la oxidación del arsenito en la cepa CIB. Será necesario trabajo futuro para comprobar, mediante HPLC acoplado a ICP-MS, la actividad arsenito oxidasa en *Azoarcus* sp. CIB frente a *Azoarcus* sp. CIB*darxA* que, presumiblemente, debería ser incapaz de oxidar arsenito a arseniato.

Debido a las dificultades técnicas que los investigadores se han encontrado en el estudio de los genes *arx* y a que su descripción es relativamente reciente, la regulación de la expresión génica del *cluster arx* es aún desconocida (Zargar *et al.*, 2010; Hernández-Maldonado *et al.*, 2017). Estudios preliminares en *A. ehrlichii* MLHE-1 permitieron determinar que *arxA* sólo se induce anaeróbicamente en presencia de arsenito, no siendo inducible por arseniato (Zargar *et al.*, 2010), y la inducción de este mismo gen en presencia de arsenito durante la fotosíntesis anaeróbica en *Ectothiorhodospira* PHS-1 fue de hasta 140 veces (Zargar *et al.*, 2012). Estas observaciones previas son coincidentes con lo observado en *Azoarcus* sp. CIB, en el cual *arxA* se vio fuertemente inducido en presencia de arsenito solamente en condiciones anaeróbicas (Fig. 55). Sin embargo, aún no se ha podido determinar en ningún organismo si los posibles genes reguladores *arxXSR*, que codifican una posible proteína de unión a arsenito (*arxX*) y un posible sistema regulador de dos componentes (*arxS* y *arxR*) controlan la expresión del *cluster arx* en presencia de arsenito de modo similar a como lo hace el sistema regulador de dos componentes *aioRS* sobre el *cluster aio* responsable de la oxidación aeróbica de arsenito en bacterias (Kashyap *et al.*, 2006; Zargar *et al.*, 2010, 2012; Hernández-Maldonado *et al.*, 2017; Oremland *et al.*, 2017). Es

conocido que la expresión del *cluster aio* es inducible tanto por arsenito como por un mecanismo desconocido de *quorum sensing*, que no ha sido reportado hasta el momento para la regulación del *cluster arx*. El regulador de respuesta AioR presumiblemente no une arsenito directamente sino que forma parte de una cascada de señalización en la que está implicada la proteína periplásmica de unión a arsenito (AioX, no presente en todas las cepas) y la histidin quinasa sensora (AioS) encargada de la transmisión de la información entre el periplasma y el citoplasma (Kashyap *et al.*, 2006; Saltikov, 2011). En este sentido, si la regulación del *cluster arx* sigue un esquema similar al del *cluster aio*, la proteína ArxX sería la encargada de unir arsenito, continuando la cascada de señalización con ArxS y ArxR, cuya fosforilación activaría la transcripción del resto de los genes *arx*.

En resumen, el trabajo presentado en esta tesis supone el estudio inicial de un nuevo *cluster arx* en una bacteria, *Azoarcus* sp. CIB, que es heterótrofa y que, por tanto, presenta una estrategia metabólica claramente diferente a la del resto de las bacterias con *clusters arx* descritas hasta la fecha (todas ellas autótrofas). *Azoarcus* sp. CIB constituye por lo tanto un nuevo modelo bacteriano para el estudio del papel biológico y la regulación de los genes *arx* de oxidación anaeróbica de arsenito y, posiblemente, su implicación en la resistencia a este compuesto tóxico que es, a la vez, fuente de energía.

IX. CONCLUSIONES

A continuación, se enumeran las principales conclusiones extraídas de este trabajo:

1. *Azoarcus* sp. CIB es capaz de establecerse como endófito colonizando los espacios intercelulares de la exodermis de la raíz de arroz, constituyendo el primer ejemplo de bacteria de su género perteneciente al grupo especializado en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos capaz de adaptarse a un estilo de vida endófito.
2. *Azoarcus* sp. CIB presenta características promotoras del crecimiento de plantas tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de IAA. La inoculación de arroz con la cepa CIB tiene un efecto positivo en la producción de biomasa vegetal, confirmando a esta bacteria como un organismo PGP.
3. La implementación de una nueva propiedad PGP en *Azoarcus* sp. CIB mediante la expresión del gen *acdS* de *B. phytofirmans* PsJN, que codifica una ACC desaminasa, demuestra que la clonación y expresión heteróloga de un gen *acdS* en una bacteria que interacciona con arroz es una estrategia exitosa para promover el crecimiento de la planta en ambientes contaminados que inducen estrés celular.
4. Mediante la inactivación de los genes diana implicados en la biosíntesis de los *pili* tipo IV y del flagelo se ha confirmado que la movilidad bacteriana juega un papel primordial en el establecimiento del estilo de vida endófito en *Azoarcus* sp. CIB.
5. Mediante un análisis transcriptómico en respuesta a extractos de raíz de arroz se han identificado algunas de las adaptaciones que *Azoarcus* sp. CIB debe realizar durante la transición de un estilo de vida libre a un estilo de vida endófito. Se observó una inducción general de los mecanismos de respuesta a estrés, modificaciones significativas en el metabolismo y la inducción de un *cluster* de biosíntesis de exopolisacárido (*eps*) que no había sido identificado con anterioridad. La

inactivación del *cluster eps* confirmó finalmente su implicación en la colonización endófitra de arroz por parte de la cepa CIB.

6. Se ha estudiado en *Azoarcus* sp. CIB cómo afecta la modificación de los niveles intracelulares de di-GMPc a su capacidad de colonización del arroz, observándose que cualquier modificación en la homeostasis del di-GMPc afecta negativamente a la interacción planta-bacteria. Se ha determinado que el di-GMPc actúa, al menos, controlando la expresión de los genes de síntesis de *pili* tipo IV y del flagelo implicados en la interacción con la planta.
7. El análisis de resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a diferentes metales pesados y metaloides permitió confirmar su tolerancia a cadmio, níquel, zinc, selenito, telurito, arseniato y arsenito, lo que está de acuerdo con la existencia en el cromosoma de la bacteria de dos islas genómicas que contienen gran abundancia de genes similares a los descritos para la resistencia/utilización de estos compuestos.
8. *Azoarcus* sp. CIB es capaz de reducir intracelularmente el selenito y telurito a selenio y telurio elemental. La reducción de estos oxianiones ocurre en la fase estacionaria del crecimiento, está ligada a condiciones de deficiencia energética en la célula, y conlleva la acumulación de nanopartículas (SeNPs y TeNPs) que son finalmente liberadas al medio tras la lisis celular.
9. *Azoarcus* sp. CIB posee gran potencial para el desarrollo de nuevos bioprocesos de síntesis de SeNPs (y TeNPs) con un tamaño, forma y estabilidad bien definidos y que son de gran interés biotecnológico.
10. Se han realizado por primera vez estudios específicos sobre la resistencia a arsénico y los mecanismos moleculares implicados en una bacteria del género *Azoarcus*. La construcción de mutantes en los genes *ars* reveló que la resistencia a arseniato en *Azoarcus* sp. CIB está

mediada tanto por el *cluster arsRCDAB*, como por el gen *arsC2* que codifica una arseniato reductasa accesorio.

11. Se ha identificado y caracterizado el primer *cluster arx* que codifica una presunta arsenito oxidasa anaeróbica en un organismo heterótrofo, *Azoarcus* sp. CIB. Así, se ha confirmado que la cepa CIB es capaz de utilizar arsenito como fuente adicional de energía en condiciones anaeróbicas. El gen *arxA* se induce específicamente en anaerobiosis en presencia de arsenito, y su inactivación revela que también está implicado en la resistencia de la cepa CIB al arsenito.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., y Saltveit, M.E. (1992) Ethylene in plant biology. 2nd Edition. Academic Press Inc. San Diego, CA.
- Afkari, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R.S., y Stolz, J.F. (2003) The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 107-112.
- Ahmann, D., Roberts, A.L., Krumholz, L.R., y Morel, F.M.M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* **371**: 750.
- Akinsanya, M.A., Goh, J.K., Lim, S.P., y Ting, A.S.Y. (2015) Metagenomics study of endophytic bacteria in Aloe vera using next-generation technology. *Genomics data* **6**: 159-163.
- Alekhnina, O., Valkovicova, L., y Turna, J. (2011) Study of membrane attachment and in vivo co-localization of TerB protein from uropathogenic *Escherichia coli* KL53. *Gen. Physiol. Biophys.* **30**: 286-292.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amend, J.P., Saltikov, C., Lu, G.-S., y Hernandez, J. (2014) Microbial arsenic metabolism and reaction energetics. *Rev. Mineral. Geochemistry* **79**: 391-433.
- An, S.Q., Allan, J.H., McCarthy, Y., Febrer, M., Dow, J.M., y Ryan, R.P. (2014) The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.* **92**: 586-597.
- Andersen, C., Hughes, C., y Koronakis, V. (2001) Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 412-416.
- Anderson, G.L., Williams, J., y Hille, R. (1992) The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 23674-23682.
- Andrade, M.O., Alegria, M.C., Guzzo, C.R., Docena, C., Pareda Rosa, M.C., Ramos, C.H.I., y Farah, C.S. (2006) The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv citri. *Mol. Microbiol.* **62**: 537-551.
- Andres, J., Arsène-Ploetze, F., Barbe, V., Brochier-Armanet, C., Cleiss-Arnold, J., Coppée, J.Y., Dillies, M.A., Geist, L., Joublin, A., Koechler, S., Lasalle, F., Marchal, M., Médigue, C., Muller, D., Nesme, X., Plewniak, F., Proux, C., Ramírez-Bahena, M.H., Schenowitz, C., Sismeiro, O., Vallenet, D., Santini, J.M., y Bertin, P.N. (2013) Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26. *Genome Biol. Evol.* **5**: 934-953.
- Andres, J. y Bertin, P.N. (2016) The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**: 299-322.
- Antonioli, P., Lampis, S., Chesini, I., Vallini, G., Rinalducci, S., Zolla, L., y Righetti, P.G. (2007) *Stenotrophomonas maltophilia* SeTE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6854-6863.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., y Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the

- pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563-1589.
- Aragón, I.M., Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.-T., y Ramos, C. (2015) The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 604-615.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., Van Elsas, J.D., Van Vuurde, J.W.L., y Azevedo, J.L. (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4906-49014.
- Argüello, J.M. (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J. Membr. Biol.* **195**: 93-108.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V., y Kudoyarova, G.R. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* **272**: 201-209.
- Arshad, M., Saleem, M., y Hussain, S. (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol.* **25**: 356-362.
- Arteca, R.N. y Arteca, J.M. (2007) Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* **164**: 1480-1488.
- Audic, S. y Claverie, J.M. (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* **7**: 986-995.
- Avendaño, R., Chaves, N., Fuentes, P., Sánchez, E., Jiménez, J.I., y Chavarría, M. (2016) Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. *Sci. Rep.* **6**: 37155.
- Ayers, M., Sampaleanu, L.M., Tammam, S., Koo, J., Harvey, H., Howell, P.L., y Burrows, L.L. (2009) PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J. Mol. Biol.* **394**: 128-142.
- Ba, L.A., Döring, M., Jamier, V., y Jacob, C. (2010) Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.* **8**: 4203-4216.
- Baesman, S.M., Bullen, T.D., Dewald, J., Zhang, D., Curran, S., Islam, F.S., Beveridge, T.J., y Oremland, R.S. (2007) Formation of tellurium nanocrystals during anaerobic growth of bacteria that use Te oxyanions as respiratory electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2135-2143.
- Baesman, S.M., Stolz, J.F., Kulp, T.R., y Oremland, R.S. (2009) Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respire oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic. *Extremophiles* **13**: 695-705.
- Bahrami, K., Nazari, P., Sepehrizadeh, Z., Zarea, B., y Shahverdi, A.R. (2012) Microbial synthesis of antimony sulfide nanoparticles and their characterization. *Ann. Microbiol.* **62**: 1419-1425.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., y Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-266.
- Balsanelli, E., Tuleski, T.R., de Baura, V.A., Yates, M.G., Chubatsu, L.S., de Oliveira Pedrosa,

- F., de Souza, E.M., Monteiro, R.A. (2013) Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. *PLoS One* **8**: e77001.
- Barkay, T., Miller, S.M., y Summers, A.O. (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 355-384.
- Basaglia, M., Toffanin, A., Baldan, E., Bottegal, M., Shapleigh, J.P., y Casella, S. (2007) Selenite-reducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sulae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**: 124-130.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* **16**: 729-770.
- Bedmar, E. y Olivares, J. (1979) Nitrogen fixation (Acetylene reduction) by free-living *Rhizobium meliloti*. *Curr. Microbiol.* **2**: 11-13.
- Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Baveye, P., Sampson, J., y Johnson, B. (2003) Widespread arsenic contamination of soils in residential areas and public spaces: an emerging regulatory or medical crisis? *Int. J. Toxicol.* **22**: 109-128.
- Beyhan, S., Tischler, A.D., Camilli, A., y Yildiz, F.H. (2006) Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP Level. *J. Bacteriol.* **188**: 3600-3613.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J.A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sánchez, M.B., Martínez, J.L. (2016) Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **4**: E14.
- Blázquez, B., Carmona, M., García, J.L., y Díaz, E. (2008) Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ. Microbiol.* **10**: 474-482.
- Bloemberg, G. V y Lugtenberg, B.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- Böhm, M., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 526-533.
- Bondarczuk, K. y Piotrowska-Seget, Z. (2013) Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol. Toxicol.* **29**: 397-405.
- Borghese, R., Baccolini, C., Francia, F., Sabatino, P., Turner, R.J., y Zannoni, D. (2014) Reduction of chalcogen oxyanions and generation of nanoprecipitates by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Hazard Mater* **269**: 24-30.
- Borghese, R., Brucale, M., Fortunato, G., Lanzi, M., Mezzi, A., Valle, F., Cavallini, M., y Zannoni, D. (2016) Extracellular production of tellurium nanoparticles by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Hazard. Mater.* **309**: 202-209.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., y Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **75**: 827-842.

Bibliografía

- Bottini, R., Cassán, F., y Piccoli, P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 497-503.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., y Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 807-838.
- Buonaurio, R. (2008) Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. *Res. Signpost* **37**: 169-197.
- Burg, S.P. y Burg, E.A. (1966) The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**: 262-269.
- Buschart, A., Sachs, S., Chen, X., Herglotz, J., Krause, A., y Reinhold-Hurek, B. (2012) Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPS in rice-*Azoarcus* sp. strain BH72 interactions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 191-199.
- Butler, C.S., Debieux, C.M., Dridge, E.J., Splatt, P., y Wright, M. (2012) Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*. *Biochem Soc Trans* **40**: 1239-1243.
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S., y Rosen, B.P. (1995) The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* **177**: 981-986.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., López-Barragán, M.J., García, J.L., y Díaz, E. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**: 71-133.
- Chandrangsu, P., Rensing, C., y Helmann, J.D. (2017) Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**: 338-350.
- Chanway, C.P. (1996) Endophytes: they're not just fungi! *Can. J. Bot.* **74**: 321-322.
- Chasteen, T.G. y Bentley, R. (2003) Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* **103**: 1-25.
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., y Vásquez, C.C. (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 820-832.
- Chatterjee, S., Killiny, N., Almeida, R.P.P., y Lindow, S.E. (2010) Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **23**: 1356-1363.
- Chen, J., Bhattacharjee, H., y Rosen, B.P. (2015) ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol. Microbiol.* **96**: 1042-1052.
- Chen, J., Yoshinaga, M., Garbinski, L.D., y Rosen, B.P. (2016) Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Mol. Microbiol.* **100**: 945-53.

- Chen, M.H., Sheu, S.Y., James, E.K., Young, C.C., y Chen, W.M. (2013) *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 3755-3761.
- Chiang, S.-K., Lou, Y.C., y Chen, C. (2008) NMR solution structure of KP-TerB, a tellurite-resistance protein from *Klebsiella pneumoniae*. *Protein Sci.* **17**: 785-789
- Chung, J.W., Altman, E., Beveridge, T.J., y Speert, D.P. (2003) Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implications in exopolysaccharide production, pilus expression, and persistence in the mouse. *Infect. Immun.* **71**: 904-909.
- Compant, S., Clément, C., y Sessitsch, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 669-678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., y Barka, E.A. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959.
- Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E., y Clément, C. (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 84-93.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., y Sessitsch, A. (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* **62**: 188-197.
- Cordeiro, F.A., Tadra-Sfeir, M.Z., Huergo, L.F., De Oliveira Pedrosa, F., Monteiro, R.A., y De Souza, E.M. (2013) Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. *J. Proteome Res.* **12**: 1142-1150.
- Correa-Llantén, D.N., Muñoz-ibacache, S.A., Maire, M., y Blamey, J.M. (2014) Enzyme involvement in the biosynthesis of selenium nanoparticles by *Geobacillus wiggelsii* strain GWE1 isolated from a drying oven. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* **8**: 629-633.
- Cortese, M.S., Paszczynski, A., Lewis, T.A., Sebat, J.L., Borek, V., y Crawford, R.L. (2002) Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *Biometals* **15**: 103-120.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., y Moënné-Loccoz, Y. (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**: 505-512.
- Crozier, L., Hedley, P.E., Morris, J., Wagstaff, C., Andrews, S.C., Toth, I., Jackson, R.W., y Holdem, N.J. (2016) Whole-transcriptome analysis of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 (Sakai) suggests plant-species-specific metabolic responses on exposure to spinach and lettuce extracts. *Front. Microbiol.* **7**: 1088.
- Cullen, W.R. y Reimer, K.J. (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* **89**: 713-764.
- Daigle, F., Lerat, S., Bucca, G., Sanssouci, É., Smith, C.P., Malouin, F., y Beaulieu, C. (2015) A *terD* domain-encoding gene (SCO2368) is involved in calcium homeostasis and participates

- in calcium regulation of a DosR-Like regulon in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **197**: 913-923.
- Danhorn, T. y Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 401-422.
- Darzens, A. (1994) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **11**: 137-53.
- Davière, J. M. y Achard, P. (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-1151.
- Debieux, C.M., Dridge, E.J., Mueller, C.M., Splatt, P., Paszkiewicz, K., Knight, I., Florance, H., Love, J., Titball, R.W., Lewis, R.J., Richardson, D.J., y Butler, C.S. (2011) A bacterial process for selenium nanosphere assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 13480-13485.
- Delmar, J.A., Su, C.-C., y Yu, E.W. (2015) Heavy metal transport by the CusCFBA efflux system. *Protein Sci.* **24**: 1720-1736.
- DeMoll-Decker, H. y Macy, J.M. (1993) The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium. *Arch. Microbiol.* **160**: 241-247.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. y Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic. Acids. Res.* **36**: W465-9.
- Dhanjal, S. y Cameotra, S.S. (2010) Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb. Cell Fact.* **9**: 52.
- Díaz, E., Jiménez, J.I., y Nogales, J. (2013) Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**: 431-442.
- Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A., y Riveros-Rosas, H. (2007) Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* **274**: 6215-6227.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., y Kothe, E. (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 1687-1696.
- Dinse, T. (2014) Investigating the type VI secretion system in diazotrophic, grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Tesis Doctoral. Universidad de Bremen.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., y DuBow, M.S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **177**: 2050-2056.
- Dixon, R. (1998) The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. *Arch. Microbiol.* **169**: 371-380.
- Dobias, J., Suvorova, E.I., y Bernier-Latmani, R. (2011) Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology* **22**: 195605.

- Dong, Z., Zelmer, C.D., Luit, B., Canny, M.J., Dong, Z., Faustino, R.S., Verssey, J.K., Pan, B., Pierce, G.N., McCully, M.G. (2002) Evidence for protection of nitrogenase from O₂ by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology* **148**: 2293-2298.
- Dörr, J., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (1998) Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* **30**: 7-17.
- Durante-Rodríguez, G., Mancheño, J.M., Rivas, G., Alfonso, C., García, J.L., Díaz, E., y Carmona, M. (2013) Identification of a missing link in the evolution of an enzyme into a transcriptional regulator. *PLoS One* **8**: e57518.
- Dworkin, M. y Foster, J.W. (1958) Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* **75**: 592-603.
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J.C., Vangronsveld, J., y Weyens, N. (2015) Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microb. Biotechnol.* **8**: 707-715.
- Egener, T., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (1999) Endophytic Expression of *nif* Genes of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in Rice Roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 813-819.
- Egener, T., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (1998) Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 71-75.
- Eilers, K.G., Lauber, C.L., Knight, R., y Fierer, N. (2010) Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 896-903.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Misui, H., y Minamisawa, K. (2001) Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5285-5293.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R., y Kuhn, P. (2001) Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**: 125-132.
- Engelhard, M., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**: 131-41.
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., y Huante, P. (2013) Agrobiotechnological importance of the ACC deaminase in rhizobacteria, a review. *Rev. Fitotec. Mex.* **36**: 251-258.
- Faoro, H., Rene Menegazzo, R., Battistoni, F., Gyaneshwar, P., do Amaral, F.P., Taulé, C., Rausch, S., Gonçalves Galvão, P., de los Santos, C., Mitra, S., Heijo, G., Sheu, S.Y., Chen, W.M., Mareque, C., Zibetti Tadra-Sfeir, M., Ivo Baldani, J., Paula Guimarães, A., Stacey, G., de Souza, F.O., Magalhães Cruz, L., y James, E.K. (2017) The oil-contaminated soil diazotroph *Azoarcus olearius* DQS-4^T is genetically and phenotypically similar to the model grass endophyte *Azoarcus* sp. BH72. *Environ. Microbiol. Rep.* **9**: 223-238.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., y Delong, E.F. (2008) The Microbial Engines That Drive Earth's

- Biogeochemical Cycles. *Science* (80-.). **320**: 1034-1039.
- Farrar, K., Bryant, D., y Cope-Selby, N. (2014) Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnol. J.* **12**: 1193-1206.
- Fendorf, S., Michael, H.A., y van Geen, A. (2010) Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in south and southeast asia. *Science*. **328**: 1123-1127.
- Fernández-Llamosas, H., Castro, L., Blázquez, M.L., Díaz, E., y Carmona, M. (2017) Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Azoarcus* sp. *CIB Microb. Cell Fact.* **15**: 109.
- Fernández-Llamosas, H., Castro, L., Blázquez, M.L., Díaz, E., y Carmona, M. (2017) Speeding up bioproduction of selenium nanoparticles by using *Vibrio natriegens* as microbial factory. *Sci. Rep.* **7**: 16046.
- Fernández-Llamosas, H., Prandoni, N., Fernández-Pascual, M., Fajardo, S., Morcillo, C., Díaz, E., y Carmona, M. (2014) *Azoarcus* sp. CIB, an anaerobic biodegrader of aromatic compounds shows an endophytic lifestyle. *PLoS One* **9**: e110771.
- Fernández-Pascual, M., Pozuelo, J.M., Serra, M.T., y De Felipe, M.R. (1988) Effects of cyanazine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *J. Plant Physiol.* **133**: 288-294.
- Fernández, M., Udaondo, Z., Niqui, J.-L., Duque, E., y Ramos, J. L. (2014) Synergic role of the two *ars* operons in arsenic tolerance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**: 483-489.
- Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A., y Cleveland, C.C. (2009) Global patterns in belowground communities. *Ecol. Lett.* **12**: 1238-1249.
- Fleming, A. (1932) On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. *J. Pathol.* **35**: 831-842.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., y Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 563-575.
- Franche, C., Lindström, K., y Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321**: 35-59.
- Freel, K.C., Krueger, M.C., Farasin, J., Brochier-Armanet, C., Barbe, V., Andrès, J., Cholley, P.E., Dillies, M.A., Jagla, B., Koecher, S., Leva, Y., Magdelenat, G., Plewniak, K., Proux, C., Coppée, J.Y., Bertin, P.N., Heipieper, H.J., y Arsène-Ploetze, F. (2015) Adaptation in toxic environments: arsenic genomic islands in the bacterial genus *Thiomonas*. *PLoS One* **10**: e0139011.
- Gadd, G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**: 609-643.
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S., y Dunfield, K.E. (2013) Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am. J. Bot.* **100**: 1738-1750.
- Gao, S., Romdhane, S. Ben, Beullens, S., Kaefer, V., Lambrichts, I., Fauvart, M., y Michiels, J.

- (2014) Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in *Rhizobium etli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 4589-4602.
- Garbisu, C., Carlson, D., Adamkiewicz, M., Yee, B.C., Wong, J.H., Resto, E., Leighton, T., y Buchanan, B.B.. (1999) Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress. *Biofactors* **10**: 311-319.
- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F.P., Moore, E.R.B., Campbell, C.D., Ryan, D., y Dowling, D.N. (2004) Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 109-118.
- Gerrard, T.L., Telford, J.N., y Williams, H.H. (1974) Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **119**: 1057-1060.
- Gilbert, J.A., Neufeld, J.D., Raux-Deery, E., Warren, M., y Smith, A. (2014) Life in a world without microbes. *PLoS Biol.* **12**: e1002020.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y., y Burrows, L.L. (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 740-772.
- Glick, B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**: 30-39.
- Glick, B.R. (2015) Beneficial Plant-Bacterial Interactions. 1st Edition. Springer International Publishing.
- Glick, B.R. (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**: 1-7.
- Glick, B.R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. **2012**: 1-15.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., y Duan, J. (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 329-339.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., y Li, J. (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
- Glickmann, E. y Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 793-796.
- Goldstein, A.H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1**: 51-57.
- Gonzalez-Gil, G., Lens, P.N.L., y Saikaly, P.E. (2016) Selenite reduction by anaerobic microbial aggregates: microbial community structure, and proteins associated to the produced selenium spheres. *Front. Microbiol.* **7**: 571.
- Gopal, M. y Gupta, A. (2016) Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Front. Microbiol.* **7**: 1971.
- Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T.,

Bibliografía

- Uberbacher, E., Tuskan, G.A., Vilgalys, R., Doktycz, M.J., y Schadt, C.W. (2011) Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5934-5944.
- Grass, G. y Rensing, C. (2001) Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 2145-2147.
- Green, E.R. y Mecsas, J. (2016) Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiol. Spectr.* **4**.
- Green, H.H. (1918) Description of a bacterium which oxydizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolation from a cattle-dipping tank. *S. Afr. J. Sci.* **14**: 465-467.
- Großkinsky, D.K., Tafner, R., Moreno, M. V., Stenglein, S.A., García de Salamone, I.E., Nelson, L.M., Novak, D., Strnad, M., van der Graaff, E., y Roitsch, T. (2016) Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **6**: 23310.
- Gupta, P. y Diwan, B. (2017) Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* **13**: 58-71.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B., y Ladha, J.K. (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**: 2634-2345.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., y Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.
- Han, Y., Wang, R., Yang, Z., Zhan, Y., Ma, Y., Ping, S., Zhang, L., Lin, M., y Yan, Y. (2015) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 1119-1128.
- Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., y Rensing, C. (2005) New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 215-226.
- Hao, X., Li, X., Pal, C., Hobman, J., Larsson, D.G.J., Saquib, Q., Alwathnani, H.A., Rosen, B.P., Zhu, Y.G., y Rensing, C. (2017) Bacterial resistance to arsenic protects against protist killing. *BioMetals* **30**: 307-311.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., y Sessitch, A. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**: 293-320.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., y van Elsas, J.D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**: 463-471.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rosselló-Mora, R., y Widdel, F. (1999) Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 999-1004.
- Harrison, F.H. y Harwood, C.S. (2005) The *pimFABCDE* operon from *Rhodopseudomonas*

- palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* **151**: 727-736.
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., Berg, G., Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D.V, y Berg, G. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**: 235-257.
- Hauberg-Lotte, L., Klingenberg, H., Scharf, C., Böhm, M., Plessl, J., Friedrich, F., Völker, U, Becker, A., y Reinhold-Hurek, B. (2012) Environmental factors affecting the expression of *pilAB* as well as the proteome and transcriptome of the grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *PLoS One* **7**: e30421.
- Hedges, R.W. y Baumberg, S. (1973) Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **115**: 459-460.
- Heider, J. y Böck, A. (1993) Selenium metabolism in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **35**: 71-109.
- Helaine, S., Dyer, D.H., Nassif, X., Pelicic, V., y Forest, K.T. (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 15888-15893.
- Hernandez-Maldonado, J., Sanchez-Sedillo, B., Stoneburner, B., Boren, A., Miller, L., McCann, S., Rosen, M., Oremland, R.S., y Saltikov, C.W. (2017) The genetic basis of anoxygenic photosynthetic arsenite oxidation. *Environ. Microbiol.* **19**: 130-141.
- Hickman, J.W. y Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **69**: 376-389.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., y Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A* **102**: 14422-14427.
- Hider, R.C., Kong, X., Murray, A., Niyaz, N., Ding, P., Miller, M.J., Malouin, F., White, M.F., Challis, G.L., y Naismith, J.H. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 637-657.
- Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung and Brache. *Arb. der Dtsch. Landwirtschaft. Gesellschaft* **98**: 59-78.
- Hockin, S.L. y Gadd, G.M. (2003) Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7063-7072.
- Hoefl-McCann, S., Boren, A., Hernandez-Maldonado, J., Stoneburner, B., Saltikov, C., Stolz, J., y Oremland, R.S. (2016) Arsenite as an electron donor for anoxygenic photosynthesis: description of three strains of *Ectothiorhodospira* from Mono Lake, California and Big Soda Lake, Nevada. *Life* **7**: 1.
- Honma, M. y Shimomura, T. (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem* **42**: 1825-1831.
- Hoppe, J., Ünal, C.M., Thiem, S., Grimpe, L., Goldmann, T., Gaßler, N., Richter, M., Shevchuk, O., Steinert, M. (2017) PilY1 promotes *Legionella pneumophila* infection of human lung

- tissue explants and contributes to bacterial adhesion, host cell invasion, and twitching motility. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 63.
- Hunter, W.J. y Manter, D.K. (2009) Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. *Curr. Microbiol.* **58**: 493-498.
- Hurek, T., Egner, T., y Reinhold-Hurek, B. (1997) Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., Proteobacteria of the beta subclass. *J. Bacteriol.* **179**: 4172-4178.
- Hurek, T., Handley, L.L., Reinhold-Hurek, B., y Piché, Y. (2002) *Azoarcus* Grass Endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 233-242.
- Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. (1995) Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs, *Azoarcus* spp., by analyses of partial 16S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2257-2261.
- Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* **106**: 169-178.
- Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. (2005) Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. En: Werner D., Newton W.E. (eds), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress*. Springer, Dordrecht.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., y Kellenberger, E. (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* **176**: 1913-1923.
- Hurek, T., Wagner, B., y Reinhold-Hurek, B. (1997) Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4331-4339.
- Innerebner, G., Knief, C., y Vorholt, J.A. (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a controlled model system. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 3202-3210.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V. V., de M Pereira, L., y de Souza Filho, G.A. (2012) Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. *Int. Microbiol.* **15**: 79-78.
- Jackson, C.R. y Dugas, S.L. (2003) Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol. Biol.* **3**: 18.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P.M., Olivares, F.L., y Ladha, J.K. (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 894-906.
- Jameson, P.E. (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regul.* **32**: 369-380.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Cieśla, J., Ginalska, G., y Bieganski, A. (2015) Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial

- p>attachment and surface properties.
- Plant Soil*
- 388**
- : 211-227.
- Jenal, U., Reinders, A., y Lori, C. (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**: 271-284.
- Ji, G. y Silver, S. (1992) Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **174**: 3684-3694.
- Jiménez-Mejía, R., Campos-García, J., y Cervantes, C. (2006) Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**: 178-184.
- Johnson, J.M. y Church, G.M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J. Mol. Biol.* **287**: 695-715.
- Johnson, M.D.L., Garrett, C.K., Bond, J.E., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., y Redinbo, M.R. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 binds integrin in an RGD- and calcium-dependent manner. *PLoS One* **6**: e29629.
- Juárez, J.F., Zamarro, M.T., Eberlein, C., Boll, M., Carmona, M., y Díaz, E. (2013) Characterization of the *mbd* cluster encoding the anaerobic 3-methylbenzoyl-CoA central pathway. *Environ. Microbiol.* **15**: 148-166.
- Kaiser, D. (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol.* **17**: 561-570.
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B.T., Sintim, H.O. (2013) Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* **42**: 305-341.
- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 27-30.
- Kapulnik, Y., Okon, Y., y Henis, Y. (1985) Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* **31**: 881-887.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., y McDermott, T.R. (2006) Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **188**: 1081-1088.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B., y Murray, T.S. (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1026-1043.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 634-644.
- Kessi, J. (2006) Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **152**: 731-743.
- Kessi, J. y Hanselmann, K.W. (2004) Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 50662-50669.
- Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., y Bachofen, R. (1999) Reduction of selenite and

- detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4734-4740.
- Keunen, E., Schellingen, K., Vangronsveld, J., y Cuypers, A. (2016) Ethylene and metal stress: small molecule, big impact. *Front. Plant Sci.* **7**: 23.
- Khan, M.S., Zaidi, A., y Wani, P.A. (2007) Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. *Agron. Sustain. Dev.* **27**: 29-43.
- Kieber, J.J. y Schaller, G.E. (2014) Cytokinins. *Arab. B.* **12**: e0168.
- Kim, B. y Park, B.K. (2012) Synthesis of self-aligned tellurium nanotubes by a sodium thiosulfate-assisted polyol method. *Electron. Mater. Lett.* **8**: 33-36.
- Kim, W.T., Silverstone, A., Yip, W.K., Dong, J.G., y Yang, S.F. (1992) Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol.* **98**: 465-471.
- Klement, Z. (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* **199**: 299-300.
- Klonowska, A., Heulin, T., y Vermeglio, A. (2005) Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5607-5609.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., y Pechère, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**: 5990-5996.
- Konishi, M., Kanbe, M., McMurtry, J.L., y Aizawa, S.I. (2009) Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of Flil, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J. Bacteriol.* **191**: 6186-6191.
- Krafft, T. y Macy, J.M. (1998) Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* **255**: 647-53.
- Krasteva, P.V., Giglio, K.M., y Sondermann, H. (2012) Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci.* **21**: 929-948.
- Krause, A., Ramakumar, A., Bartels, D., Battistoni, F., Bekel, T., Boch, J., Böhm, M., Friedrich, F., Hurek, T., Krause, L., Linke, B., McHardy, A.C., Sarkar, A., Schneiker, S., Syed, A.A., Thauer, R., Vorhölter, F.J., Pühler, A., Reinhold-Hurek, B., Kaiser, O., y Goesmann, A. (2006) Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1385-1391.
- Kuchma, S.L., Griffin, E.F., y O'Toole, G.A. (2012) Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J. Bacteriol.* **194**: 5388-5403.
- Kuroda, M., Dey, S., Sanders, O.I., y Rosen, B.P. (1997) Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 326-331.
- Kuroda, M., Yamashita, M., Miwa, E., Imao, K., Fujimoto, N., Ono, H., Nagano, K., Sei, K., e Ike, M. (2011) Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon, encoding the respiratory selenate reductase complex, from the selenate-reducing bacterium *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. *J. Bacteriol.* **193**: 2141-2148.

- Kurth, D., Amadio, A., Ordoñez, O.F., Albarracín, V.H., Gärtner, W., y Farías, M.E. (2017) Arsenic metabolism in high altitude modern stromatolites revealed by metagenomic analysis. *Sci. Rep.* **7**: 1024.
- Laguerre, G., Bossand, B., y Bardin, R. (1987) Free-living dinitrogen-fixing bacteria isolated from petroleum refinery oily sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1674-1678.
- Lampis, S., Zonaro, E., Bertolini, C., Bernardi, P., Butler, C.S., y Vallini, G. (2014) Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. *Microb. Cell Fact.* **13**: 35.
- Lampis, S., Zonaro, E., Bertolini, C., Cecconi, D., Monti, F., Micaroni, M., Turner, R.J., Butler, C.S., y Vallini, G. (2017) Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: Novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **324**: 3-14.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., y Lory, S. (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**: 1474-1484.
- Legatzki, A., Franke, S., Lucke, S., Hoffmann, T., Anton, A., Neumann, D., y Nies, D.H. (2003) First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation* **14**: 153-168.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., y Turner, R.J. (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Publ. Gr.* **11**: 371-384.
- Lett, M.C., Muller, D., Lièvremon, D., Silver, S., y Santini, J. (2012) Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *J. Bacteriol.* **194**: 207-208.
- Lewis, R.S. y Nicholson, J.S. (2007) Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* **54**: 727-740.
- Li, B., Liu, N., Li, Y., Jing, W., Fan, J., Li, D., Zhang, L., Zhang, X., Zang, Z., y Wang, L. (2014) Reduction of selenite to red elemental selenium by *Rhodopseudomonas palustris* strain N. *PLoS One* **9**: e95955.
- Li, D.B., Cheng, Y.Y., Wu, C., Li, W.W., Li, N., Yang, Z.C., Tong, Z.H., y Yu, H.Q. (2014) Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. *Sci. Rep.* **4**: 3735.
- Li, L., Li, Y., Lim, T.M., y Pan, S.Q. (1999) GFP-aided confocal laser scanning microscopy can monitor *Agrobacterium tumefaciens* cell morphology and gene expression associated with infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 141-146.
- Li, Q., Chen, T., Yang, F., Liu, J., y Zheng, W. (2010) Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine. *Mater. Lett.* **64**: 614-617.
- Li, R., Yu, C., Li, Y., Lam, T.-W., Yiu, S.-M., Kristiansen, K., y Wang, J. (2009) SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25**: 1966-1967.
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Zhang, X., Yang, L., y Li, C. (2007) Rapid, room-temperature synthesis of amorphous selenium/protein composites using *Capsicum annuum* L extract.

- Nanotechnology* **18**: 405101.
- Li, X., Hu, Y., Gong, J., Lin, Y., Johnstone, L., Rensing, C., y Wang, G. (2012) Genome sequence of the highly efficient arsenite-oxidizing bacterium *Achromobacter arsenitoxydans* SY8. *J. Bacteriol.* **194**: 1243-1344.
- Liang, Z.X. (2015) The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **32**: 663-683.
- Liao, V.H.C., Chu, Y.J., Su, Y.C., Hsiao, S.Y., Wei, C.C., Liu, C.W., Liao, C.M, Shen, W.C., y Chang, K.J. (2011) Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *J. Contam. Hydrol.* **123**: 20-29.
- Lin Chua, S., Liu, Y., Li, Y., Jun Ting, H., Kohli, G.S., Cai, Z., Suwanchaikasem, P., Kau Kit Goh, K., Pin Ng, S., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., y Givskov, M. (2017) Reduced intracellular c-di-GMP content increases expression of quorum sensing-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 451.
- Lipman, J.G. y Waksman, S.A. (1923) The oxidation of selenium by a new group of autotrophic microorganisms. *Science*. **57**: 60.
- van Lis, R., Nitschke, W., Duval, S., y Schoepp-Cothenet, B. (2013) Arsenics as bioenergetic substrates. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1827**: 176-188.
- Liu, X., Beyhan, S., Lim, B., Linington, R.G., y Yildiz, F.H. (2010) Identification and characterization of a phosphodiesterase that inversely regulates motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **192**: 4541-4552.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402-408.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J.J., y Linthorst, H.J.M.M. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**: 184-191.
- van Loon, L.C. y Glick, B.R. (2004) Increased plant fitness by rhizobacteria. En: Sandermann, H. (ed), *Molecular Ecotoxicology of Plants. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Loper, J.E. y Buyer, J.S. (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 5-13.
- López-Barragán, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, M., Boll, M., Fuchs, G., García, J.L., y Díaz, E. (2004) The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism in *Azoarcus* sp. CIB. *J. Bacteriol.* **186**: 5462-5774.
- López-Maury, L., Florencio, F.J., y Reyes, J.C. (2003) Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**: 5363-5371.
- López-Maury, L., Sanchez-Riego, A.M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2009) The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **191**: 3534-3543.
- de Lorenzo, C.A., Fernández-Pascual, M.M., y de Felipe, M.R. (1998) Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma* **201**: 71-

84.

- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- Lovley, D.R. y Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 285-289.
- Lynch, J.M. (1990) Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotechnol. Adv.* **8**: 335-346.
- Ma, J.F. (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 267-281.
- Macy, J.M., Santini, J.M., Pauling, B. V, O'Neill, A.H., y Sly, L.I. (2000) Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch. Microbiol.* **173**: 49-57.
- Maier, B. y Wong, G.C.L. (2015) How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends Microbiol.* **23**: 775-788.
- Mal, J., Veneman, W.J., Nanchaiah, Y. V., van Hullebusch, E.D., Peijnenburg, W.J.G.M., Vijver, M.G., y Lens, P.N.L. (2017) A comparison of fate and toxicity of selenite, biogenically, and chemically synthesized selenium nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Nanotoxicology* **11**: 87-97.
- Malasarn, D., Keffe, J.R., y Newman, D.K. (2008) Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* **190**: 135-142.
- Manoil, C. y Beckwith, J. (1985) TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**: 8129-8133.
- Maret, W. (2016) The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: E66.
- de María, N., de Felipe, M.R., y Fernández-Pascual, M. (2005) Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 985-996.
- Martín-Moldes, Z. (2014) Caracterización del sistema regulador de dos componentes híbrido TolR en *Azoarcus* sp. CIB. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid
- Martín-Moldes, Z., Blázquez, B., Baraquet, C., Harwood, C.S., Zamarro, M.T., y Díaz, E. (2016) Degradation of cyclic diguanosine monophosphate by a hybrid two-component protein protects *Azoarcus* sp. strain CIB from toluene toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **113**: 13174-13179.
- Martín-Moldes, Z., Zamarro, M.T., del Cerro, C., Valencia, A., Gómez, M.J., Arcas, A., Udaondo, Z., García, J.L., Nogales, J., Carmona, M., y Díaz, E. (2015) Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 462-471.
- Martin, P., DeMel, S., Shi, J., Gladysheva, T., Gatti, D.L., Rosen, B.P., y Edwards, B.F. (2001) Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel

- arsenic detoxification enzyme. *Structure* **9**: 1071-1081.
- Martinez-Gil, M. y Ramos, C. (2018) Role of cyclic di-GMP in the bacterial virulence and evasion of the plant immunity. *Curr. Issues Mol. Biol.* **25**: 199-222.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., y Alvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 430-449.
- Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L., y Ramos-González, M. (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* **8**: R179.
- Matilla, M.A., Travieso, M.L., Ramos, J.L., y Ramos-González, M.I. (2011) Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ. Microbiol.* **13**: 1745-1766.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 289-314.
- McCarter, L.L. y Gomelsky, M. (2015) Fifty ways to inhibit motility via cyclic di-GMP: the emerging *Pseudomonas aeruginosa* swarming story. *J. Bacteriol.* **197**: 406-409.
- McCarthy, Y., Ryan, R.P., O'Donovan, K., He, Y.Q., Jiang, B.L., Feng, J.X., Tang, J.L., y Dow, J.M. (2008) The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 819-824.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- McCully, M.E. (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 983-990.
- Mcewan, A.G., Ridge, J.P., Mcdevitt, C.A., y Hugenholtz, P. (2002) The DMSO Reductase family of microbial molybdenum enzymes; molecular properties and role in the dissimilatory reduction of toxic elements. *Geomicrobiol. J.* **19**: 3-21.
- Melville, S. y Craig, L. (2013) Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**: 323-341.
- Mendes, R., Garbeva, P., y Raaijmakers, J.M. (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 634-663.
- Meneses, C.H.S.G., Rouws, L.F.M., Simoes-Araujo, J.L., Vidal, M.S., y Baldani, J.I. (2011) Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**: 1448-1458.
- Meng, Y.L., Liu, Z., y Rosen, B.P. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**: 18334-18341.
- Mercado-Blanco, J. y Prieto, P. (2012) Bacterial endophytes and root hairs. *Plant Soil* **361**: 301-306.

- Messens, J. y Silver, S. (2006) Arsenate Reduction: Thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J. Mol. Biol.* **362**: 1-17.
- Minamino, T., Imada, K., y Namba, K. (2008) Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**: 693-701.
- Mitter, B., Petric, A., Shin, M.W., Chain, P.S.G., Hauberg-Lotte, L., Reinhold-Hurek, B., Novak, J., y Sessitch, A. (2013) Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 120.
- Molina-Henares, M.A., Ramos-González, M.I., Daddaoua, A., Fernández-Escamilla, A.M., y Espinosa-Urgel, M. (2017) FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components. *Res. Microbiol.* **168**: 36-45.
- Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M.J., Martínez-Pérez, O., y Santero, E. (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macroglutabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **185**: 2026-2030.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D., y White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1729-1739.
- Morgan, P.W. y Drew, M.C. (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plant.* **100**: 620-630.
- Morimoto, Y. y Minamino, T. (2014) Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* **4**: 217-234.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., y Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**: 621-628.
- Murphy, J.N. y Saltikov, C.W. (2009) The ArsR repressor mediates arsenite-dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* **191**: 6722-6731.
- Nadar, S.V., Yoshinaga, M., Kandavelu, P., Sankaran, B., y Rosen, B.P. (2014) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the Arsl C-As lyase from *Thermomonospora curvata*. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.* **70**: 761-764.
- Nancharaiyah, Y. V. y Lens, P.N.L. (2015) Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 61-80.
- Narayanan, K.B. y Sakthivel, N. (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci* **156**: 1-13.
- Nawaz, F., Ahmad, R., Ashraf, M.Y., Waraich, E.A., y Khan, S.Z. (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicol Env. Saf.* **113**: 191-200.
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., y Erbs, G. (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 139.
- Newton, W.E. (1997) Molybdenum-nitrogenase: structure and function. En, *Biological Fixation of*

- Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Springer Berlin, Heidelberg.
- Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V.H., y Cornelis, G.R. (1997) Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J. Bacteriol.* **179**: 612-619.
- Ng, J.C., Wang, J., y Shraim, A. (2003) A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere* **52**: 1353-1359.
- Nguyen, Y., Sugiman-Marangos, S., Harvey, H., Bell, S.D., Charlton, C.L., Junop, M.S., y Burrows, L.L. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin. *J. Biol. Chem.* **290**: 601-611.
- Nian, H.J., Zhang, J., Liu, S., Song, F.P., y Huang, D.F. (2010) Effect of bacteriophage and exopolysaccharide on root colonization and rhizosphere competence by *Pseudomonas fluorescens*. *Ann. Microbiol.* **60**: 369-372.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 313-339.
- Nies, D.H. (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 2707-2712.
- Nieto, K.F. y Frankenberger, W.T. (1989) Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 967-972.
- Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I., y Ali Malboobi, M. (2014) Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran. J. Microbiol.* **6**: 285-295.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., y Downie, J.A. (2011) The Rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 119-144.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., y Curran, S. (2004) Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 52-60.
- Oremland, R.S., Hollibaugh, J.T., Maest, A.S., Presser, T.S., Miller, L.G., y Culbertson, C.W. (1989) Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2333-2343.
- Oremland, R.S., Saltikov, C.W., Stolz, J.F., y Hollibaugh, J.T. (2017) Autotrophic microbial arsenotrophy in arsenic-rich soda lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**: 443-467.
- Oremland, R.S. y Stolz, J.F. (2005) Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* **13**: 45-49.
- Oremland, R.S. y Stolz, J.F. (2003) The Ecology of Arsenic. *Science*. **300**: 939-944.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., y Hollibaugh, J.T. (2004) The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 15-27.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., y López-Bucio, J. (2009) The

- role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* **4**: 701-712.
- van Overbeek, L.S., van Doorn, J., Wichers, J.H., van Amerongen, A., van Roermund, H.J.W., y Willemsen, P.T.J. (2014) The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front. Microbiol.* **5**: 104.
- Páez-Espino, A.D., Durante-Rodríguez, G., y de Lorenzo, V. (2015) Functional coexistence of twin arsenic resistance systems in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **17**: 229-238.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., De Lorenzo, V., y Cánovas, D. (2009) Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals* **22**: 117-130.
- Pankievicz, V.C.S., Camilios-Neto, D., Bonato, P., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M.Z., Faoro, H., Chubatsu, L.S., Donatti, L., Wajnberg, G., Passetti, F., Monteiro, R.A., Pedrosa, F.O., y Souza, E.M. (2016) RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Mol. Biol.* **90**: 589-603.
- Park, Y.G., Mun, B.G., Kang, S.M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C.W., Kim, A.Y., Lee, S.U., Oh, K.Y., Lee, D.Y., Lee, I.J., Yun, B.W. (2017) *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS One* **12**: e0173203.
- Parte, S.G., Mohekar, A.D., y Kharat, A.S. (2017) Microbial degradation of pesticide: A review. *African J. Microbiol. Res.* **11**: 992-1012.
- Partridge, J.D., Nieto, V., y Harshey, R.M. (2015) A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. *MBio* **6**: e02367.
- Patten, C.L. y Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**: 207-220.
- Patten, C.L. y Glick, B.R. (2002) Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* **48**: 635-642.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., y Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP Binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a «backstop brake» mechanism. *Mol. Cell* **38**: 128-139.
- Pawlowski, K. y Sirrenberg, A. (2003) Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J. Exp. Biol.* **41**: 1165-1183.
- Penrose, D.M. y Glick, B.R. (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* **118**: 10-15.
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I.M., Prada-Ramírez, H.A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T., y Sanjuán, J. (2014) Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* **9**: e91645.
- Pérez-Mendoza, D. y Sanjuán, J. (2016) Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**: 36-43.
- Pérez, J.M., Calderón, I.L., Arenas, F.A., Fuentes, D.E., Pradenas, G.A., Fuentes, E.L.,

Bibliografía

- Pradenas, E.L., Sandoval, J.M., Castro, M.E., Elías, A.O., y Vásquez, C.C. (2007) Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PLoS One* **2**: e211.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., y van der Putten, W.H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 789-799.
- Pilet, P.E. y Saugy, M. (1987) Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA: a critical reexamination. *Plant Physiol.* **83**: 33-38.
- Pillai, S.D., Nakatsu, C.H., Miller, R. V., y Yates, M. V. (2015) Manual of Environmental Microbiology. 4th Edition. American Society of Microbiology. Washington.
- Pinchot, G.B. (1967) The mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation by 2,4-dinitrophenol. *J Biol Chem* **242**: 4577-4583.
- Pinton, R., Varanini, Z., y Nannipieri, P. (2001) The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. 2nd Edition. CRC Press. New York.
- Pitzer, J.E., Sultan, S.Z., Hayakawa, Y., Hobbs, G., Miller, M.R., y Motaleb, M.A. (2011) Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect. Immun.* **79**: 1815-1825.
- Pongratz, R. y Heumann, K.G. (1999) Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. *Chemosphere* **39**: 89-102.
- Poupin, M.J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., y González, B. (2013) Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **8**: e69435.
- Prasad, K.S., Vyas, P., Prajapati, V., Patel, P., y Selvaraj, K. (2012) Biomimetic synthesis of selenium nanoparticles using cell-free extract of *Microbacterium* sp. ARB05. *Micro. Nano. Lett.* **7**: 1.
- Prigent-Combaret, C., Sanguin, H., Champier, L., Bertrand, C., Monnez, C., Colillon, C., Blaha, D., Ghigo, J.M., Cournoyer, B., Sanfuin, H., Chamier, L., Bertrand, C., Monnez, C., y Collillon, C. (2012) The bacterial thiopurine methyltransferase tellurite resistance process is highly dependent upon aggregation properties and oxidative stress response. *Env. Microbiol* **14**: 2645-2660.
- Prithivirajsingh, S., Mishra, S.K., y Mahadevan, A. (2001) Functional analysis of a chromosomal arsenic resistance operon in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Mol. Biol. Rep.* **28**: 63-72.
- Qin, J., Rosen, B.P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., y Rensing, C. (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 2075-2080.
- Rabus, R. (2005) Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 580-587.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., y Reinhardt, R. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **183**: 27-36.

- Rabus, R., Trautwein, K., y Wöhlbrand, L. (2014) Towards habitat-oriented systems biology of «*Aromatoleum aromaticum*» EbN1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 3371-3388.
- Rahaman, M.M., Morshed, M.G., Sultanul Aziz, K.M., y Munshi, M.M. (1986) Improved medium for isolating *Shigella*. *Lancet* **1**: 271-272.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., y Cervantes, C. (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* **21**: 321-332.
- Ramos-Ruiz, A., Field, J.A., Wilkening, J. V, y Sierra-Alvarez, R. (2016) Recovery of elemental tellurium nanoparticles by the reduction of tellurium oxyanions in a methanogenic microbial consortium. *Environ. Sci. Technol.* **50**: 1492-500.
- Ramos, C., Mølbak, L., y Molin, S. (2000) Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 801-809.
- Ramos, J.F. y Webster, T.J. (2012) Cytotoxicity of selenium nanoparticles in rat dermal fibroblasts. *Int. J. Nanomedicine* **7**: 3907-3914.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, T., y Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 326-356.
- Ranjard, L., Nazaret, S., y Cournoyer, B. (2003) Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3784-3790.
- Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., y Cournoyer, B. (2002) Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase. *J. Bacteriol.* **184**: 3146-3149.
- Rathgeber, C., Yurkova, N., Stackebrandt, E., Beatty, J.T., y Yurkov, V. (2002) Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4613-4622.
- Rayman, M.P. (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br. J. Nutr.* **100**: 254-268.
- Reinhold-Hurek, B., Bünger, W., Burbano, C.S., Sabale, M., y Hurek, T. (2015) Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**: 403-424.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., y De Ley, J. (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 574-584.
- Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (1997) *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots. *Plant Soil* **194**: 57-64.
- Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**: 139-144.

- Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 435-443.
- Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (2000) Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus sensu lato* and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 649-659.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., y De Ley, J. (1993) *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-Fixing Proteobacteria Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and Description of Two Species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 574-584.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Montagu, M. Van, y Hurek, T. (2006) An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **19**: 181-188.
- Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E.G., y Fendrik, I. (1986) Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 520-526.
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.
- Rhine, E.D., Phelps, C.D., y Young, L.Y. (2006) Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environ. Microbiol.* **8**: 899-908.
- Rodríguez-Freire, L., Sun, W., Sierra-Alvarez, R., y Field, J.A. (2012) Flexible bacterial strains that oxidize arsenite in anoxic or aerobic conditions and utilize hydrogen or acetate as alternative electron donors. *Biodegradation* **23**: 133-143.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., y Selman, G. (2000) Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* **84**: 155-161.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**: 319-339.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., y Triplett, E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1**: 283-290.
- Römling, U., Galperin, M.Y., y Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**: 1-52.
- Rosen, P. (1971) Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *J. Theor. Biol.* **32**: 425-426.
- Rosenblueth, M. y Martínez-Romero, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 827-837.
- Rosso, M.L., Chauvaux, S., Dessein, R., Laurans, C., Frangeul, L., Lacroix, C., Schiavo, A., Dillies, M.A., Foulon, J., Coppée, J.Y., Médigue, C., Carniel, E., Simoent, M., y Marceau, M. (2008) Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in human plasma: impacts on virulence and metabolic gene expression. *BMC Microbiol.* **8**: 211.

- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., y Coves, J. (2001) Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 769-773.
- Ruiz-Díez, B., Quiñones, M.A., Fajardo, S., López, M.A., Higuera, P., y Fernández-Pascual, M. (2012) Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 543-554.
- Russell, M.H., Bible, A.N., Fang, X., Gooding, J.R., Campagna, S.R., Gomelsky, M., y Alexandre, G. (2013) Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *MBio* **4**: e00001-13
- Ryan, R.P. (2013) Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology* **159**: 1286-1297.
- Ryan, R.P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C.S., Armitage, J.P., y Dow, J.M. (2010) Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 5989-5994.
- Sabaty, M., Avazeri, C., Pignol, D., y Vermeiglio, A. (2001) Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5122-5126.
- Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A., y Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**: 841-847.
- Salkowski, E. (1885) Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Zeitschrift für Physiol. Chemie* **9**: 23-33.
- Saltikov, C.W. (2011) Regulation of arsenic metabolic pathways in prokaryotes. En: Stolz, J., Oremland, R. (eds), *Microbial Metal and Metalloid Metabolism*. ASM Press, Washington, DC.
- Saltikov, C.W. y Newman, D.K. (2003) Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 10983-10988.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York,
- Sampedro, I., Parales, R.E., Krell, T., y Hill, J.E. (2014) *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 17-46.
- Sandhiya, G.S., Sugitha, T.C.K., Balachandar, D., y Kumar, K. (2005) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian J. Exp. Biol.* **43**: 802-807.
- Santi, C., Bogusz, D., y Franche, C. (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* **111**: 743-767.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Del, M., Orozco-Mosqueda, C., y Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* **183**: 92-99.
- Sarathchandra, S.U. y Watkinson, J.H. (1981) Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium*. *Science* **211**: 600-601.
- Sarkar, A., Marszałkowska, M., Schäfer, M., Pees, T., Klingenberg, H., Macht, F., y Reinhold-

- Hurek, B. (2017) Global expression analysis of the response to microaerobiosis reveals an important cue for endophytic establishment of *Azoarcus* sp. BH72. *Environ. Microbiol.* **19**: 198-217.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schalk, I.J., Hannauer, M., y Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**: 2844-2854.
- Schiavon, M. y Pilon-Smits, E.A.H. (2017) Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: a review. *J. Environ. Qual.* **46**: 10-19.
- Schmid, J., Sieber, V., y Rehm, B. (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* **6**: 496.
- Schreiter, S., Ding, G.-C., Heuer, H., Neumann, G., Sandmann, M., Grosch, R., Kropfs, S., y Smalla, K. (2014) Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front. Microbiol.* **5**: 144.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E.A., Salles, J.F., van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Wang-Pruski, G., y Nowak, J. (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1187-1192.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Haubert, Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D., y Reinhold-Hurek, B. (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic Analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**: 28-36.
- Sheibani-Tezerji, R., Rattei, T., Sessitsch, A., Trognitz, F., y Mitter, B. (2015) Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* **6**: 1-11.
- Shen, S., Li, X.F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., y Le, X.C. (2013) Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* **113**: 7769-7792.
- Shi, W., Wu, J., y Rosen, B.P. (1994) Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 19826-19829.
- Shidore, T., Dinse, T., Öhrlein, J., Becker, A., y Reinhold-Hurek, B. (2012) Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environ. Microbiol.* **14**: 2775-2787.
- Shimada, T., Sakazaki, R., Fujimura, S., Niwano, K., Mishina, M., y Takizawa, K. (1990) A new selective, differential agar medium for isolation of *Vibrio cholerae* O1: PMT (polymyxin-mannose-tellurite) agar. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **43**: 37-41.
- Shirsat, S., Kadam, A., Naushad, M., Mane, R.S., Guo, R., Wang, Y., Zhang, D., Wang, J., Lens, P.N.L. (2015) Selenium nanostructures: microbial synthesis and applications. *RSC Adv.* **5**: 92799-92811.

- Shoeibi, S., Mozdziak, P., y Golkar-Narenji, A. (2017) Biogenesis of selenium nanoparticles using green chemistry. *Top. Curr. Chem.* **375**: 88.
- Silver, S., y Phung, L.T. (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 599-608.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., y Römling, U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**: 1123-1134.
- Singh, R.P., Shelke, G.M., Kumar, A., y Jha, P.N. (2015) Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to "stress ethylene" produced in plants. *Front. Microbiol.* **6**: 937.
- Skotnicka, D., Petters, T., Heering, J., Hoppert, M., Kaefer, V., y Sogaard-Andersen, L. (2015) c-di-GMP regulates type IV pili-dependent-motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **198**: 77-90.
- Smith, A.T., Smith, K.P., y Rosenzweig, A.C. (2014) Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**: 947-960.
- Smyth, E.M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M.R., Dow, J.M., O'Gara, F., y Doohan, F.M. (2011) *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria: a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* **111**: 683-692.
- Song, B., Haggblom, M.M., Zhou, J., Tiedje, J.M., y Palleroni, N.J. (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1129-1140.
- Souza, R. de, Ambrosini, A., y Passaglia, L.M.P. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* **38**: 401-419.
- Spaepen, S. y Vanderleyden, J. (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: a001438.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. (2009) Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* **51**: 284-320.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 425-448.
- Sparks, D.L. (2007) Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements* **1**: 193-197.
- Srivastava, D., Harris, R.C., y Waters, C.M. (2011) Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **193**: 6331-6341.
- Srivastava, D. y Waters, C.M. (2012) A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* **194**: 4485-4493.
- Staicu, L.C., Oremland, R.S., Tobe, R., y Mihara, H. (2017) Bacteria versus selenium: a view from the inside out. *Plant Ecophysiol.* **11**: 79-108.
- Staicu, L.C.C., Ackerson, C.J.J., Cornelis, P., Ye, L., Berendsen, R.L.L., Hunter, W.J.J., Noblitt,

- S.D., Henry, C.S., Cappa, J.J., Monteneri, R.L., Wong, A.O., Musilova, L., Sura-de Jong, M., van Hullebusch, E.D., Lens, P.N.L., Reynolds, R.J.B., y Pilon-Smith, E.A.H. (2015) *Pseudomonas moraviensis* subsp. *stanleyae*, a bacterial endophyte of hyperaccumulator *Stanleya pinnata*, is capable of efficient selenite reduction to elemental selenium under aerobic conditions. *J. Appl. Microbiol.* **119**: 400-410.
- Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoel, C., Kirisits, M.J., Starner, T.D., Wozniak, D.J., Harwood, C.S., y Parsek, M.R. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* **191**: 3492-503.
- Steffens, B. (2014) The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding responses in rice. *Front. Plant Sci.* **5**: 685.
- Stein, T., Hayen-Schneeg, N., y Fendrik, I. (1997) Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 969-971.
- Stolz, J.F., Basu, P., y Oremland, R.S. (2010) Microbial arsenic metabolism: new twists on an old poison. *Microbe Mag.* **5**: 53-59.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M., y Oremland, R.S. (2006) Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol* **60**: 107-130.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Fernandez, N., Sanz, J.L., Amils, R., Legatzki, A., Maier, R.M., y Field, J.A. (2009) Molecular characterization and in situ quantification of anoxic arsenite-oxidizing denitrifying enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**: 72-85.
- Taghavi, S., Wu, X., Ouyang, L., Zhang, Y.B., Stadler, A., McCorkle, S., Wei, Z., Maslov, S., y van der Lelie, D. (2015) Transcriptional responses to sucrose mimic the plant-associated life style of the plant growth promoting endophyte enterobacter sp. 638. *PLoS One* **10**: 1-22.
- Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., y Benziman, M (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**: 4416-4425.
- Tam, K., Ho, C.T., Lee, J.-H., Lai, M., Chang, C.H., Rheem, Y., Chen, W., Hur, H.G., y Myung, N.V. (2010) growth mechanism of amorphous selenium nanoparticles synthesized by *Shewanella* sp. HN-41. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 696-700.
- Tan, Z., Hurek, T., y Reinhold-Hurek, B. (2003) Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* **5**: 1009-1015.
- Tao, G.C., Tian, S.J., Cai, M.Y., y Xie, G.H. (2008) Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* **18**: 515-523.
- Tarazona, S., García, F., Ferrer, A., Dopazo, J., y Conesa, A. (2012) NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBnet J.* **17**: 18.
- Taylor, D.E. (1999) Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* **7**: 111-115.

- Taylor, D.E., Hou, Y., Turner, R.J., y Weiner, J.H. (1994) Location of a potassium tellurite resistance operon (tehA tehB) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**: 2740-2742.
- Taylor, D.E., Rooker, M., Keelan, M., Ng, L.-K., Martin, I., Perna, N.T., Burland, N.T., y Blattner, F.R. (2002) Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J. Bacteriol.* **184**: 4690-4698.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., y Sutton, D.J. (2012) Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* **101**: 133-164.
- Thorne, E.T., Young, B.M., Young, G.M., Stevenson, J.F., Labavitch, J.M., Matthews, M.A., y Rost, T.L. (2006) The structure of xylem vessels in grapevine (*Vitaceae*) and a possible passive mechanism for the systemic spread of bacterial disease. *Am. J. Bot.* **93**: 497-504.
- Tian, X., Cao, L., Tan, H., Han, W., Chen, M., Liu, Y., y Zhou, S. (2007) Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb. Ecol.* **53**: 700-707.
- Timm, C.M., Pelletier, D.A., Jawdy, S.S., Gunter, L.E., Henning, J.A., Engle, N., Aufrecht, J., Gee, G., Nookawew, I., Yang, Z., Lu, T.Y., Tschaplinski, T.J., Doktycz, M.J., Tuskan, G.p., y Weston, D.J. (2016) two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system. *Front. Plant Sci.* **7**: 497.
- Tinggi, U. (2008) Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ. Health Prev. Med.* **13**: 102-108.
- Tischler, A.D. y Camilli, A. (2005) Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* **73**: 5873-5882.
- Tomei, F.A., Barton, L.L., Lemanski, C.L., Zocco, T.G., Fink, N.H., y Sillerud, L.O. (1995) Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 329-336.
- Torres, S.K., Campos, V.L., Leónn, C.G., Rodríguez-Llamazares, S.M., Rojas, S.M., González, M., Smith, C., y Mondaca, M.A. (2012) Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *J. Nanoparticle Res.* **14**: 1236.
- Torto-Alalibo, T., Collmer, C.W., Lindeberg, M., Bird, D., Collmer, A., y Tyler, B.M. (2009) Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9**: S3.
- Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., y Poinssot, B. (2014) The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytol.* **201**: 1371-1384.
- Treesubuntorn, C., Dhurakit, P., Khaksar, G., y Thiravetyan, P. (2017) Effect of microorganisms on reducing cadmium uptake and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **1**: 1-12.
- Tremaroli, V., Fedi, S., y Zannoni, D. (2007) Evidence for a tellurite-dependent generation of

- reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Arch. Microbiol.* **187**: 127-135.
- Tsang, J. y Hoover, T.R. (2014) Requirement of the flagellar protein export apparatus component FliO for optimal expression of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **196**: 2709-2717.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., y Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9**: S2.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., y Saier, M.H. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 107-125.
- Tugarova, A. V. y Kamnev, A.A. (2017) Proteins in microbial synthesis of selenium nanoparticles. *Talanta* **174**: 539-547.
- Turkovicova, L., Smidak, R., Jung, G., Turna, J., Lubec, G., y Aradska, J. (2016) Proteomic analysis of the TerC interactome: Novel links to tellurite resistance and pathogenicity. *J. Proteomics* **136**: 167-173.
- Turner, A.W. (1949) Bacterial oxidation of arsenite. *Nature* **164**: 76-77.
- Turner, R.J., Borghese, R., y Zannoni, D. (2012) Microbial processing of tellurium as a tool in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **30**: 954-963.
- Turner, R.J., Hou, Y., Weiner, J.H., y Taylor, D.E. (1992) The arsenical ATPase efflux pump mediates tellurite resistance. *J. Bacteriol.* **174**: 3092-3094.
- Uthus, E.O. (2003) Arsenic essentiality: A role affecting methionine metabolism. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **16**: 345-355.
- Valderrama, J.A., Durante-Rodríguez, G., Blázquez, B., García, J.L., Carmona, M., y Díaz, E. (2012) Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. *J. Biol. Chem.* **287**: 10494-10508.
- Versées, W., Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Steyaert, J. (2007) The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 Å resolution. *FEBS J.* **274**: 2363-2375.
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., y Giovannetti, L. (2014) Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 633-659.
- Wadhwani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., y Chopade, B.A. (2016) Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 2555-2566.
- Wadhwani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., y Chopade, B.A. (2018) Biosynthesis of gold and selenium nanoparticles by purified protein from *Acinetobacter* sp. SW 30. *Enzyme Microb. Technol.* **111**: 81-86.
- Walter, E.G., Thomas, C.M., Ibbotson, J.P., y Taylor, D.E. (1991) Transcriptional analysis, translational analysis, and sequence of the kilA-tellurite resistance region of plasmid RK2Ter. *J. Bacteriol.* **173**: 1111-1119.

- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., y Bassler, B.L. (2008) quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* **190**: 2527-2536.
- Watson, C., Niks, D., Hille, R., Vieira, M., Schoepp-Cothenet, B., Marques, A.T., Romão, M.J., Santos-Silva, T., y Santini, J.M. (2017) Electron transfer through arsenite oxidase: Insights into Rieske interaction with cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1858**: 865-872.
- Weyens, N., Beckers, B., Schellingen, K., Ceulemans, R., van der Lelie, D., Newman, L., Taghavi, S., Carleer, R., y Vangronsveld, J. (2015) The Potential of the Ni-resistant TCE-degrading *Pseudomonas putida* W619-TCE to reduce phytotoxicity and improve phytoremediation efficiency of poplar cuttings on a Ni-TCE co-contamination. *Int. J. Phytoremediation* **17**: 40-48.
- Weyens, N., Croes, S., Dupae, J., Newman, L., van der Lelie, D., Carleer, R., y Vangronsveld, J. (2010) Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environ. Pollut.* **158**: 2422-2427.
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., Semmler, A.B., Mellick, A.S., Martin, P.R., Alm, R.A., Hobbs, M., Beatson, S.A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J.C., Engel, J.N., Darzins, A., y Mattick, J.S. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **52**: 873-893.
- Williams, P.N., Islam, M.R., Adomako, E.E., Raab, A., Hossain, S.A., Zhu, Y.G., Feldmann, J., y Meharg, A.A. (2006) Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 4903-4908.
- Wirth, R., Friesenegger, A., y Fiedler, S. (1989) Transformation of various species of Gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 175-177.
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., y Banfield, M.J. (2013) On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 761-776.
- Wolfe, A.J. y Visick, K.L. (2008) Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* **190**: 463-475.
- Wu, D.Q., Ye, J., Ou, H.Y., Wei, X., Huang, X., He, Y.W., y Xu, Y. (2011) Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics* **12**: 438.
- Wu, J. y Rosen, B.P. (1993) Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J. Biol. Chem.* **268**: 52-58.
- Wu, J., Tisa, L.S., y Rosen, B.P. (1992) Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 12570-12576.
- Xiao, Y., Liu, H., Nie, H., Xie, S., Luo, X., Chen, W., y Huang, Q. (2017) Expression of the phosphodiesterase BifA facilitating swimming motility is partly controlled by FliA in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiologyopen* **6**: e00402.
- Xie, S., Wu, H., Chen, L., Zang, H., Xie, Y., y Gao, X. (2015) Transcriptome profiling of *Bacillus*

- subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiol.* **15**: 21.
- Xu, C., Shi, W., y Rosen, B.P. (1996) The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 2427-2432.
- Yamamura, S. y Amachi, S. (2014) Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *J. Biosci. Bioeng.* **118**: 1-9.
- Yang, F., Tian, F., Li, X., Fan, S., Chen, H., Wu, M., Yang, C.H., y He, C. (2014) The degenerate EAL-GGDEF domain protein filp functions as a cyclic di-GMP receptor and specifically interacts with the PilZ-domain protein PXO_02715 to regulate virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**: 578-589.
- Yang, H.C., Fu, H.L., Lin, Y.F., y Rosen, B.P. (2012) Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* **69**: 325-358.
- Yang, H.C. y Rosen, B.P. (2016) New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed. J.* **39**: 5-13.
- Yang, J., Rawat, S., Stemmler, T.L., y Rosen, B.P. (2010) Arsenic binding and transfer by the ArsD As(III) metallochaperone. *Biochemistry* **49**: 3658-3666.
- Yang, S.F. y Hoffman, N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Abd El-Fattah, F.K., Squartini, A., Corich, V., Giacomini, A., de Bruijn, F., Rademaker, J., Maya-Flores, J., Ostrom, P., Vega-Hernández, M., Hollingsworth, R., Martínez-Molina, E., Mateos, P., Velázquez, E., Wopereis, J., Triplett, E., Umali-García, M., Anarna, J.A., Rolfe, B., Ladha, J.K., Hill, J., Mujoo, R., Ng, P.K., y Dazoo, F.B. (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Plant Physiol* **28**: 845-870.
- Yekutieli, D. y Benjamini, Y. (2001) The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* **29**: 1165-1188.
- Yi, Y., de Jong, A., Frenzel, E., y Kuipers, O.P. (2017) Comparative transcriptomics of *Bacillus mycoides* strains in response to potato-root exudates reveals different genetic adaptation of endophytic and soil isolates. *Front. Microbiol.* **8**: 1487.
- Yim, H.H. y Villarejo, M. (1992) *osmY*, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 3637-44.
- Zannoni, D., Borsetti, F., Harrison, J.J., y Turner, R.J. (2007) The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te. *Adv Microb Physiol* **53**: 1-72.
- Zargar, K., Conrad, A., Bernick, D.L., Lowe, T.M., Stolc, V., Hoeft, S., Oremland, R.S., Stolz, S., y Saltikov, C.W. (2012) ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environ. Microbiol.* **14**: 1635-1645.
- Zargar, K., Hoeft, S., Oremland, R., y Saltikov, C.W. (2010) Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arsenite-oxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. *J. Bacteriol.* **192**: 3755-3762.
- Zawadzka, A.M., Crawford, R.L., y Paszczynski, A.J. (2006) Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid)

- produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3119-3129.
- Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Yu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q. y Zhang, R. (2015) Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics* **16**: 685.
- Zhang, Y.B., Monchy, S., Greenberg, B., Mergeay, M., Gang, O., Taghavi, S., y van der Lelie, D. (2009) ArsR arsenic-resistance regulatory protein from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**: 161-170.
- Zhang, Y., Wei, C., Jiang, W., Wang, L., Li, C., Wang, Y., Dow, J.M., y Sun, W. (2013) The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. *PLoS One* **8**: e59428.
- Zhao, R., Schuster, S.C., y Khan, S. (1995) Structural effects of mutations in *Salmonella typhimurium* flagellar switch complex. *J. Mol. Biol.* **251**: 400-412.
- Zhou, T., Radaev, S., Rosen, B.P., y Gatti, D.L. (2000) Structure of the ArsA ATPase: the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO J.* **19**: 4838-4845.
- Zonaro, E., Lampis, S., Turner, R.J., Qazi, S.J.S., y Vallini, G. (2015) Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. *Front. Microbiol.* **6**: 584.